



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

ANDREA HULINA

**ULOGA IZVANSTANIČNOG PROTEINA  
Hsp70 I NJEGOVIH RECEPTORA U  
KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ  
BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

ANDREA HULINA

**THE ROLE OF EXTRACELLULAR PROTEIN  
Hsp70 AND ITS RECEPTORS IN CHRONIC  
OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Andrea Hulina

**ULOGA IZVANSTANIČNOG PROTEINA  
Hsp70 I NJEGOVIH RECEPTORA U  
KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ  
BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Lada Rumora

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Andrea Hulina

# **THE ROLE OF EXTRACELLULAR PROTEIN Hsp70 AND ITS RECEPTORS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Professor Lada Rumora, PhD

Zagreb, 2017

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u znanstvenom području Biomedicina i zdravstvo, polje Farmacija, grana Medicinska biokemija.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i u Experimental Pulmonology and Inflammation Research (EXPIRE) laboratoriju, University Medical Center Groningen, Groningen, Nizozemska, pod mentorstvom prof. dr. sc. Lade Rumora u sklopu istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Uloga stresnog proteina Hsp70 u imunosno-upalnom odgovoru kod kronične opstruktivske plućne bolesti“  
(IP-2014-09-1247).



Ovaj doktorski rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-1247.

*Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ladi Rumora na predloženoj temi, stručnom vodstvu, idejama, savjetima, prenesenom znanju, pomoći oko obrade podataka i ukazanom povjerenju tijekom cjelokupne izrade ovoga rada.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Irene Heijink, Marnixu Jonkeru, Jacobien Noordhoek i ostalim članovima EXPIRE laboratorija na University Medical Center Groningen u Nizozemskoj, koji su me prihvatili kao ravnopravnog člana svoga laboratorija, na prenesenom znanju, konstruktivnim kritikama, savjetima i svoj pruženoj pomoći.*

*Veliko hvala doc. dr. sc. Mariji Grdić Rajković na pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada i pisanja članaka.*

*Dr. sc. Aniti Somborac Bačura, dr. sc. Danieli Jakšić Despot, Andrei Čeri, Vesni Boričević, Suzani Hrajinik Trninić i Martini Galeković zahvaljujem na podršci, savjetima i pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić, prof. dr. sc. Ivani Čepelak, prof. dr. sc. Karmeli Barišić i prof. dr. sc. Sanji Dabelić na stručnoj potpori i savjetima.*

*Dr. sc. Dubravku Jeliću, dr. sc. Martini Bosnar, Biserki Ragač i Ani Cvetković hvala na pomoći i prenesenom znanju oko rada sa staničnim linijama i monocitima te u određivanju citokina.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Sanji Popović-Grle, dr. sc. Andrei Vukić Dugac i akademiku Miroslavu Samaržiji iz Klinike za plućne bolesti Jordanovac, KBC Zagreb na suradnji tijekom izrade ovog rada.*

*Diplomanticama Luciji Sladoljev, Tini Smoljanović, Dori Radić i Ani Dojder zahvaljujem na pomoći oko izvođenja dijela eksperimenata.*

*Svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju zahvaljujem na suradnji i prijateljstvu.*

*Hvala mojoj obitelji, posebno Mateji i Tomislavu na pruženoj podršci i pomoći, ljubavi, strpljenju i razumijevanju tijekom svih godina uložених u izradu ove disertacije.*

## SAŽETAK

Izvanstanični Hsp70 (eHsp70) pripada skupini molekularnih obrazaca oštećenja (DAMP), a može aktivirati stanice imunskog sustava vezujući se za receptore slične Tollu (TLR) 2 i 4 te tako poticati sintezu upalnih citokina. U bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolešću (KOPB), jednim od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u svijetu, koja je karakterizirana kroničnom upalom dišnih putova, izmjerene su povišene koncentracije eHsp70 u krvi. Cilj ispitivanja bio je utvrditi uzrokuje li sam izvanstanični Hsp70 aktivaciju imunskog i upalnog odgovora te može li modulirati upalni odgovor izazvan patogenim bakterijama ili dimom cigareta u staničnim modelima KOPB-a. Posebno su ispitivane promjene na stanicama plućnog epitela i stanicama sistemske cirkulacije. Za ispitivanje plućne komponente KOPB-a korištene su NCI-H292 stanična linija i primarne NHBE i PBEC stanice (izolirane od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om), a za ispitivanje sistemske komponente KOPB-a korištene su THP-1 stanična linija i monociti iz periferne krvi zdravih ispitanika.

Za oponašanje djelovanja eHsp70 korišten je rekombinantni humani Hsp70 (rhHsp70). Istražen je utjecaj rhHsp70 kada je prisutan sam ili zajedno s bakterijskim komponentama LPS-om i LTA te ekstraktom dima cigareta (CSE) na upalni odgovor određivanjem koncentracije upalnih citokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ . Vijabilnost stanica ispitana je MTS testom i određivanjem aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica, a njihov način umiranja mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama. Mehanizmi upalnog djelovanja ovih molekula ispitani su određivanjem aktivacije TLR2 i TLR4 receptora, MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova te korištenjem specifičnih inhibitora MAPK, NF- $\kappa$ B, Hsp70, transkripcije i translacije da bi se razjasnilo funkcionalno značenje aktivacije navedenih molekula.

Utvrđeno je da rhHsp70 značajno potiče upalni odgovor u NCI-H292 (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8), PBEC (IL-6 i IL-8) i THP-1 stanicama (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-8) te monocitima (IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ). rhHsp70 modulira upalni odgovor na LPS, LTA i CSE tako da s LPS-om uglavnom pokazuje sinergistički tip interakcija, dok je s LTA i CSE-om tip interakcija uglavnom antagonistički, ali on ovisi o koncentraciji agensa kojim tretiramo stanice i o vrsti stanica. Utjecaj samog rhHsp70 i njegove interakcije s CSE-om jače su izražene na stanicama plućnog

epitela, dok su interakcije s LPS-om i LTA više izražene na stanicama monocitno-makrofagnog sustava. Sam rhHsp70 nema značajno citotoksično djelovanje, a uglavnom djeluje zaštitno naspram citotoksičnosti LPS-a i CSE-a. Ovisno o vrsti stanica rhHsp70 može potisnuti aktivnost izvršnih kaspaza-3/7. rhHsp70 modulira ekspresiju TLR2, TLR4 i unutarstaničnog Hsp70. Svoja djelovanja rhHsp70 vrši preko MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova, koje aktivira ovisno o vrsti stanica, koncentraciji i vremenu tretiranja.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su upalno djelovanje rhHsp70 te pokazali da on modulira upalni odgovor na bakterijske komponente i na CSE. Istovremena prisutnost eHsp70, LPS-a, LTA i/ili CSE-a dovodi do smanjenog djelovanja ili do pojačane aktivacije TLR2 i TLR4 receptora, što vodi pogoršanju upale i nepovoljnim posljedicama za bolesnike s KOPB-om.

Ključne riječi: KOPB, izvanstanični Hsp70, upala, LPS, LTA, CSE



## SUMMARY

Extracellular Hsp70 (eHsp70) can act as damage-associated molecular pattern (DAMP), activate immune cells via Toll-like receptors (TLR) 2 and 4, and induce cytokine synthesis. Elevated levels of eHsp70 have been measured in blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), one of the world's leading causes of morbidity and mortality characterised by chronic airway inflammation. The aim of this study was to determine whether eHsp70 induces immune and inflammatory responses, and if it modulates inflammatory response caused by pathogens or cigarette smoke in cellular models of COPD. Its influence was assessed on pulmonary epithelial and systemic circulation cells. NCI-H292 cell line and primary NHBE and PBEC cells (isolated from healthy subjects and COPD patients) were used to assess pulmonary compartment of COPD, and THP-1 cell line and peripheral blood monocytes isolated from healthy subjects, to assess systemic compartment of COPD.

Recombinant human Hsp70 (rhHsp70) was used to mimic the effects of eHsp70. We explored the effects of rhHsp70 when present alone or together with bacterial components LPS and LTA as well as cigarette smoke extract (CSE) on inflammatory response determined by the levels of secreted pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ). We also assessed cell viability by MTS assay, and by measurements of LDH activity secreted in cell supernatants. Mode of cell death was assessed by measuring cellular activities of caspases-3/7, -8 and -9. Mechanisms of action of aforementioned molecules were explored by assessing TLR2, TLR4, MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways activation, and by using specific inhibitors of MAPK, NF- $\kappa$ B, Hsp70, transcription and translation to elucidate functional meaning of their activation.

rhHsp70 significantly induced inflammatory responses in NCI-H292 (IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-8), PBEC (IL-6 and IL-8) and THP-1 cells (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-8) as well as in monocytes (IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ). It can modulate inflammatory response to LPS, LTA and CSE, and has shown mainly synergistic type of interaction with LPS, and mainly antagonistic type of interaction with LTA and CSE, although it is cell and concentration dependent. Effects rhHsp70 alone as well as its interactions with CSE are more strongly pronounced in pulmonary epithelial cells, but interactions with LPS and LTA are more pronounced in

monocyte-macrophage cells. rhHsp70 alone is not cytotoxic and mainly has protective effects against LPS and CSE induced cytotoxicity. Depending on the cell type it can also reduce caspase-3/7 activities. rhHsp70 modulates the expression of TLR2, TLR4 and intracellular Hsp70. rhHsp70 exhibits its effects via MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways, but their activation is dependent on the type of cells, concentration and time.

Our results confirmed pro-inflammatory function of eHsp70 and showed that it modulates inflammatory response to bacterial components and CSE. Combined presence of eHsp70, LPS, LTA and/or CSE leads to desensitization or inappropriate activation of TLR2 and TLR4 receptors, which might contribute to the aggravation of chronic inflammation and lead to worsening of COPD patients' condition.

Keywords: COPD, extracellular Hsp70, inflammation, LPS, LTA, CSE

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. PROTEINI TOPLINSKOG ŠOKA.....	2
1.1.2. Protein toplinskog šoka 70 (Hsp70).....	2
1.1.3. Izvanstanični Hsp70 (eHsp70).....	4
1.2. DAMP (MOLEKULARNI OBRASCI OŠTEĆENJA).....	4
1.3. RECEPTORI ZA OBRASCE (PRR).....	5
1.3.1. Receptori slični Tollu (TLR).....	6
1.3.1.1. <i>TLR2 i TLR4 receptori</i> .....	9
1.3.2. Signalizacija TLR receptorima.....	11
1.3.2.1. <i>Signalni put ovisan o MyD88 proteinu</i> .....	11
1.3.2.2. <i>Signalni put ovisan o TRIF proteinu</i> .....	13
1.4. Kronična opstruktivska plućna bolest .....	14
1.4.1. Dijagnoza i klasifikacija KOPB-a.....	16
1.4.2. Čimbenici rizika za KOPB.....	19
1.4.3. Patogeneza KOPB-a.....	20
1.4.3.1. <i>Upala</i> .....	21
1.4.3.1.1. <i>Citokini u KOPB-u</i> .....	23
1.4.3.2. <i>Neravnotežaproteaza i antiproteaza</i> .....	25
1.4.3.3. <i>Oksidacijski stres</i> .....	26
1.4.3.4. <i>Apoptoza</i> .....	26
1.4.4. Sistemska upala u KOPB-u.....	28
1.4.5. Egzacerbacije KOPB-a.....	29
1.4.6. Hsp70 i KOPB.....	29
1.4.7. TLR2, TLR4 i KOPB.....	30
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>34</b>
3.1. Kultura stanica.....	35
3.1.1. Stanične linije.....	35
3.1.2. Primarne stanice.....	36
3.2. Presađivanje stanica.....	36
3.3. Određivanje broja stanica.....	37
3.4. Tretiranje stanica.....	38
3.4.1. Tretiranje stanica rekombinantnim humanim Hsp70 proteinom, LPS-om i s LTA	38
3.4.2. Tretiranje stanica ekstraktom dima cigareta.....	38
3.4.3. Tretiranje stanica inhibitorima.....	39
3.5. Određivanje koncentracije citokina.....	40
3.6. Određivanje vijabilnosti stanica MTS testom.....	41
3.7. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica.....	41
3.8. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9.....	42
3.9. Detekcija proteina Western blot metodom.....	42

3.9.1. Priprema staničnih lizata za Western blot analize.....	42
3.9.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu.....	43
3.9.3. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.....	43
3.9.4. Westernblot analiza.....	44
3.10. Detekcija mRNA metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stavarnom vremenu ( <i>engl.</i> quantitative PCR, qPCR).....	47
3.10.1. Izolacija RNA iz stanica.....	47
3.10.2. Sinteza cDNA.....	48
3.10.3. Određivanje ekspresije gena.....	48
3.11. Statistička obrada podataka.....	49
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>51</b>
4.1. ISPITIVANJE UPALNOG I CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA IZVANSTANIČNOG Hsp70 NA STANICAMA PLUĆNOG EPITELA.....	52
4.1.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na stanicama plućnog epitela.....	52
4.1.1.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji.....	52
4.1.1.2. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na primarnim stanicama plućnog epitela.....	54
4.1.2. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja rhHsp70 na stanicama plućnog epitela.....	56
4.1.2.1. Utjecaj rhHsp70 na vijabilnost stanica plućnog epitela (MTS test).....	56
4.1.2.2. Utjecaj rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica plućnog epitela.....	57
4.1.2.3. Utjecaj rhHsp70 na način umiranja stanica plućnog epitela.....	57
4.1.3. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela.....	59
4.1.3.1. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji.....	59
4.1.3.2. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim stanicama plućnog epitela.....	63
4.1.4. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela.....	69
4.1.4.1. Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica plućnog epitela (MTS test).....	69
4.1.4.2. Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica plućnog epitela.....	70
4.1.4.3. Utjecaj LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica plućnog epitela .....	72
4.1.5. Ispitivanje upalnog djelovanja ekstrakta dima cigareta (CSE) u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela.....	73
4.1.5.1. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji.....	73
4.1.5.2. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim stanicama plućnog epitela.....	77
4.1.6. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela.....	82
4.1.6.1. Utjecaj CSE-a i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica plućnog epitela	

<i>(MTS test)</i> .....	82
4.1.6.2. <i>Utjecaj CSE-a i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica plućnog epitela</i> .....	83
4.1.6.3. <i>Utjecaj CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica plućnog epitela</i> .....	85
4.2. ISPITIVANJE UPALNOG I CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA IZVANSTANIČNOG Hsp70 NA STANICAMA MONOCITNO-MAKROFAGNOG SUSTAVA.....	89
4.2.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....	89
4.2.1.1. <i>Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na THP-1 staničnoj liniji</i> .....	89
4.2.1.2. <i>Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na primarnim monocitima</i> .....	91
4.2.2. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....	93
4.2.2.1. <i>Utjecaj rhHsp70 na vijabilnost stanica monocitno-makrofagnog sustava (MTS test)</i> .....	93
4.2.2.2. <i>Utjecaj rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica monocitno-makrofagnog sustava</i> .....	93
4.2.2.3. <i>Utjecaj rhHsp70 na način umiranja stanica monocitno-makrofagnog sustava</i> ....	94
4.2.3. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....	95
4.2.3.1. <i>Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na THP-1 staničnoj liniji</i> .....	95
4.2.3.2. <i>Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim monocitima</i> .....	98
4.2.4. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....	99
4.2.4.1. <i>Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica monocitno-makrofagnog sustava (MTS test)</i> .....	99
4.2.4.2. <i>Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica monocitno-makrofagnog sustava</i> .....	99
4.2.4.3. <i>Utjecaj LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica monocitno-makrofagnog sustava</i> .....	101
4.2.5. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....	104
4.2.5.1. <i>Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na THP-1 staničnoj liniji</i> .....	104
4.2.5.2. <i>Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim monocitima</i> .....	105
4.2.6. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....	107
4.2.6.1. <i>Utjecaj CSE-a i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica monocitno-makrofagnog sustava (MTS test)</i> .....	107
4.2.6.2. <i>Utjecaj CSE i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad</i>	

<i>stanica monocitno-makrofagnog sustava.....</i>	109
<i>4.2.6.3. Utjecaj CSE i njegovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica monocitno-makrofagnog sustava.....</i>	111
<b>4.3. ISPITIVANJE MEHANIZAMA DJELOVANJA rhHSP70, LPS-a, LTA I CSE-a NA STANIČNIM MODELIMA KOPB-a.....</b>	114
<i>4.3.1. Ispitivanje aktivacije TLR2 i TLR4 receptora.....</i>	114
<i>4.3.3.1. Ispitivanje aktivacije MAPK na stanicama plućnog epitela.....</i>	114
<i>4.3.1.2. Ispitivanje aktivacije TLR2 i TLR4 receptora na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....</i>	117
<i>4.3.2. Ispitivanje ekspresije unutarstaničnog Hsp70.....</i>	119
<i>4.3.2.1. Ispitivanje ekspresije unutarstaničnog Hsp70 na stanicama plućnog epitela.....</i>	119
<i>4.3.2.2. Ispitivanje ekspresije unutarstaničnog Hsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.....</i>	121
<i>4.3.3. Ispitivanje aktivacije MAPK.....</i>	122
<i>4.3.3.1. Ispitivanje aktivacije MAPK na stanicama plućnog epitela.....</i>	122
<i>4.3.3.2. Ispitivanje aktivacije MAPK na stanicama monocitno-makrofagnogsustava.....</i>	126
<i>4.3.4. Ispitivanje aktivacije NF-κB.....</i>	129
<i>4.3.4.1. Ispitivanje aktivacije NF-κB u stanicama plućnog epitela.....</i>	129
<i>4.3.4.2. Ispitivanje aktivacije NF-κB u stanicama monocitno-makrofagnogsustava.....</i>	130
<i>4.3.5. Utjecaj inhibitora na upalni odgovor na rhHsp70.....</i>	131
<b>5. RASPRAVA.....</b>	136
<i>5.1. Utjecaj izvanstaničnog Hsp70 na upalni odgovor i modulaciju upalnog odgovora u KOPB-u.....</i>	138
<i>5.1.1. rhHsp70 potiče izlučivanje citokina u staničnim modelima KOPB-a.....</i>	139
<i>5.1.2. rhHsp70 modulira upalni odgovor na bakterijske komponente LPS i LTA.....</i>	140
<i>5.1.3. rhHsp70 modulira upalni odgovor na CSE.....</i>	142
<i>5.1.4. Djelovanje rhHsp70 na upalni odgovor ovisi o vrsti stanica.....</i>	144
<i>5.2. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA, CSE-a i njihovih kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost i način umiranja stanica.....</i>	148
<i>5.2.1. rhHsp70 djeluje zaštitno naspram citotoksičnostibaketrijskih komponenti LPS-a i LTA.....</i>	148
<i>5.2.2. rhHsp70 potiskuje citotoksičnost uzrokovanu CSE-om.....</i>	151
<i>5.3. Mehanizmi djelovanja rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a.....</i>	154
<i>5.3.1. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora.....</i>	154
<i>5.3.2. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na aktivaciju i ekspresiju MAPK i NF-κB signalnih putova.....</i>	157
<i>5.3.3. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na ekspresiju unutarstaničnog Hsp70.....</i>	162
<i>5.4. Završna razmatranja.....</i>	163
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	165
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	169
<b>8. PRILOZI.....</b>	204
<i>Prilog A: Popis kratica.....</i>	205
<i>Prilog B: Znanstveni radovi autorice zastupljeni u Current Contents bazi.....</i>	212
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	234

Popis radova autorice.....	236
----------------------------	-----

## **1. UVOD**



## 1.1. PROTEINI TOPLINSKOG ŠOKA

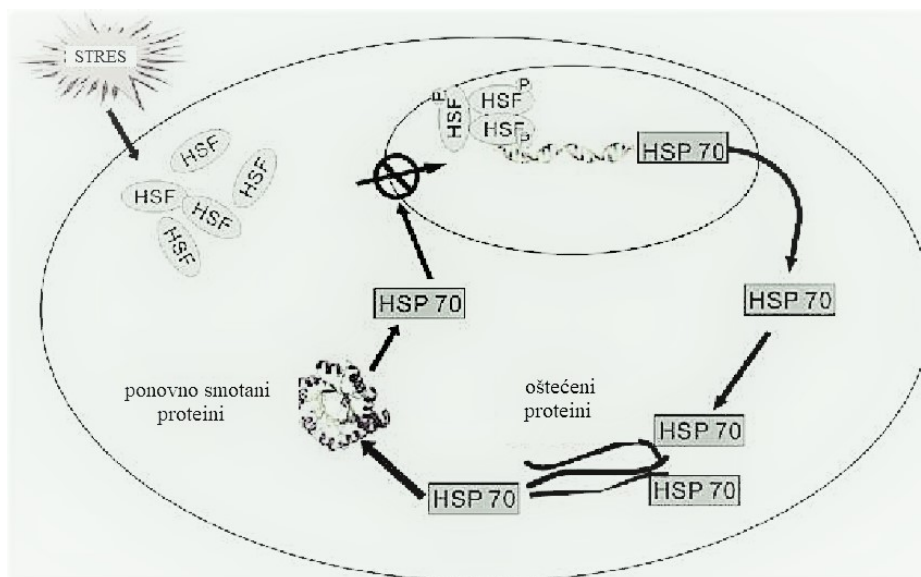
Proteini toplinskog šoka (Hsp, *engl.* heat shock protein) skupina su stresnih proteina koji su eksprimirani u stanicama svih organizama (bakterije, kvasci, biljke, životinje) (Borges i sur., 2012), a otkriveni su 1974. godine u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) (Tissi  res i sur., 1974). Imaju ulogu molekulskih šaperona kako bi se održala homeostaza stanica i tkiva, a čine oko 5-10 % ukupnih staničnih proteina, dok u stresnim uvjetima njihov udio može biti i do 15 % (Rensing i Maier, 1994). Osim povišenom temperaturom, po čemu su i dobili naziv, induciraju se različitim oblicima staničnog stresa kao što su okolišni čimbenici (teški metali, reaktivni kisikovi spojevi, ultraljubičasto i radioaktivno zračenje, citostatici i drugi lijekovi, kemikalije), patofiziološka stanja (upala, ishemija, hipoksija, virusne i bakterijske infekcije, maligne transformacije) i fiziološki čimbenici (rast i diferencijacija stanica) (Srivastava, 2008; Barišić i sur., 2003). Hsp superporodica podijeljena je u nekoliko porodica koje su dobile ime prema približnim molekulskim masama: mali Hsp proteini, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp110. Mali Hsp ne ovise o adenozin-trifosfatu (ATP), dok svi ostali Hsp ovise o ovoj molekuli. Oni u svojoj strukturi imaju dvije funkcionalno značajne domene: domenu koja veže ATP i domenu koja veže supstrat (Pockley, 2003). Hsp djeluju kao šaperoni te štite stanicu od krivo smotanih i agregiranih proteina, pomažu novosintetiziranim polipeptidnim lancima da se smotaju u odgovarajući oblik proteina, razmataju oštećene proteine i pomažu im da povrate svoju strukturu i funkciju, usmjeravaju stanične proteine do konačnog odredišta i čuvaju ih od denaturacije uzrokovane različitim stresnim podražajima (McConnell i McAlpine, 2013; Barišić, 2008; Srivastava, 2008).

### 1.1.2. Protein toplinskog šoka 70 (Hsp70)

Hsp70 skupina je proteina koja ima glavnu šaperonsku ulogu u citoplazmi stanice, a sastoji se od nekoliko članova. To su Hsc70 (Hsc73) koji je konstitutivni oblik Hsp70 i eksprimiran je u normalnim staničnim uvjetima, inducibilni Hsp70 (Hsp72), čija je aktivacija i sinteza regulirana na transkripcijskoj razini te je potaknuta stresom, zatim GRP78 ili BiP, lokaliziran unutar lumena endoplazmatskog retikuluma gdje služi kao šaperon te mitohondrijski Hsp70 (GRP75 ili mito-BiP).

Najviše izučen član Hsp70 porodice upravo je inducibilni Hsp70 molekulske mase 72 kDa čija se sinteza potiče u stanjima stresa, a čija stanična djelovanja uključuju sprječavanje

agregacije proteina, potpomaganje pravilnog smatanja novosintetiziranih polipeptidnih lanaca kao i ponovnog smatanja oštećenih proteina, čime se potiče preživljavanje stanice usprkos stresnim uvjetima (slika 1.1.). Strukturno Hsp70 uključuje dvije funkcionalne domene: regulacijsku ATP-aznu amino-terminalnu domenu bitnu za vezanje i otpuštanje drugih proteina i C-terminalnu domenu za vezanje supstrata koja veže hidrofobne regije polipeptida koji nisu smotani. U stresnim uvjetima, da bi se potaknula sinteza Hsp70, dolazi do vezanja denaturiranih proteina na Hsp te se on odvaja od transkripcijskih faktora toplinskog šoka (HSF, *engl.* heat shock transcription factor) što dovodi do fosforilacije HSF-a i stvaranja trimera koji se premještaju u jezgru, vežu na elemente toplinskog šoka (HSE, *engl.* heat shock element) u promotorskoj regiji *hsp* gena te tako potiču transkripciju Hsp. Hsp70 tada može služiti kao šaperon u procesu ovisnom o ATP-u, a ukoliko su proteini previše oštećeni i ne mogu se više popraviti Hsp70 ih usmjerava na razgradnju ubikvitin-proteosomalnim sustavom (Kim i Yenari, 2013; Pockley i sur., 2008; Pockley, 2003; Sherman i Goldberg, 2001).



**Slika 1.1.** Povećana ekspresija Hsp70 u stanjima stresa.

Preuzeto iz: Wu i sur., 2013.

### 1.1.3. Izvanstanični Hsp70 (eHsp70)

Osim svoje uobičajene lokalizacije u stanici, Hsp70 može se osloboditi iz stanice pasivnim ili aktivnim putem te se stoga može detektirati i u izvanstaničnom okolišu (eHsp70, *engl.* extracellular Hsp70). Pasivni put oslobađanja nastaje uslijed oštećenja stanične membrane i/ili nekroze stanica te se tada može osloboditi ukupan Hsp70 prisutan u citosolu, dok se aktivnim putem, kada nije prisutno stanično oštećenje ili umiranje, Hsp70 oslobađa egzocitozom. Smatra se da ovo otpuštanje može nastati i kao odgovor na stres ili upalu (Asea i sur., 2002; A. Asea i sur., 2000). Otpuštanjem eHsp70 iz stanice povećava se njegova koncentracija u izvanstaničnom prostoru što služi kao „signal za opasnosti“. Naime, eHsp70 se veže na različite membranske receptore prisutne na specifičnim imunskim stanicama te tako modulira imunosne odgovore (Johnson i Fleshner, 2006; A. Asea i sur., 2000; a Asea i sur., 2000). eHsp70 opažen je prvi put u krvi ljudi prije dvadesetak godina te se od tada istražuje njegova uloga u patogenezi različitih bolesti. Osobe s upalnim i infektivnim bolestima imale su kronično povišene koncentracije eHsp70 u odnosu na zdrave osobe slične životne dobi. Osim toga, pokazalo se da u zdravih osoba koje su izložene akutnom stresu također dolazi do povećanja razine eHsp70. Otpuštanje Hsp70 može pogoršati već aktivan imunski odgovor, što može dovesti do nepovoljnih ishoda. Moguće je i da eHsp70 ima zaštitno djelovanje kad je prisutan u nižim koncentracijama i da tada predstavlja normalan odgovor na infekciju ili stres. Ukoliko eHsp70 dostigne određeni kritični koncentracijski prag tada može potaknuti patološki upalni odgovor. Čini se da je *in vivo* djelovanje eHsp70 ovisno o kontekstu, tj. da u normalnim fiziološkim stanjima eHsp70 olakšava imunost, dok u patofiziološkim stanjima eHsp70 pogoršava upalne bolesti (Jr i sur., 2011; Pockley i sur., 2008; Johnson i Fleshner, 2006; Pockley, 2003; Wright i sur., 2000). Zbog svojeg imunomodulacijskog djelovanja smatra se da Hsp70 pripada skupini molekula koje se nazivaju molekularni obrasci oštećenja (DAMP, *engl.* damage associated molecular pattern).

### 1.2. MOLEKULARNI OBRASCI OŠTEĆENJA (DAMP)

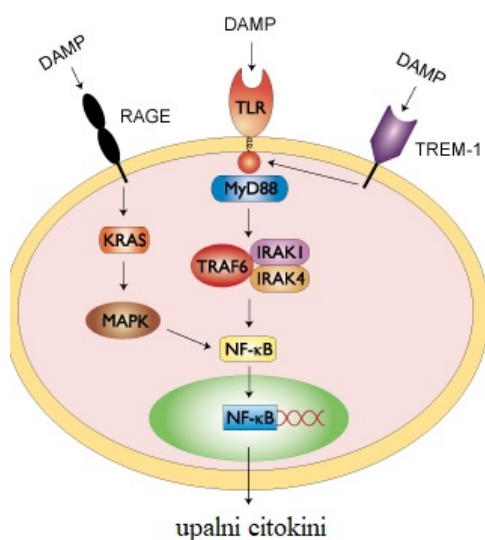
Molekularni obrasci oštećenja, poznati i kao alarmini, prvenstveno su endogene molekule koje se pri normalnim fiziološkim uvjetima nalaze unutar stanice, ali se u uvjetima staničnog stresa ili oštećenja stanica otpuštaju u izvanstanični prostor te tamo predstavljaju „signal za opasnost“ i mogu potaknuti proces sterilne upale (bez prisutnosti patogena). Niske

koncentracije DAMP molekula mogu povoljno djelovati na tkivni popravak tako da potiču fiziološki upalni odgovor, dok su u kroničnoj upali prisutne njihove visoke koncentracije. Kritičan koncentracijski prag DAMP molekula koji je potreban da se potakne razvoj bolesti može ovisiti o trajanju i stupnju oštećenja. U DAMP molekule se najčešće ubrajaju protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, *engl.* high mobility group box 1 protein) i proteini iz skupine S100 koji vežu kalcij (npr. S100A8, S100A9 i S100A12, *engl.* calcium-binding proteins). Većina istraživača ubraja Hsp70 u DAMP molekule (Pouwels i sur., 2014; Tang i sur., 2012; Jr i sur., 2011; Midwood i Piccinini, 2010; Bianchi, 2006), iako neki ukazuju na moguću prisutnost Hsp70 u staničnoj membrani (Van Eden i sur., 2013). Osim uobičajeno unutarstaničnih DAMP-ova, postoje i DAMP molekule u izvanstaničnom matriksu koje se otpuštaju pri razgradnji matriksa tijekom tkivne ozljede, npr. fibrili amiloida- $\beta$  i hijaluronski fragmenti. Osim toga, nekrozne stanice mogu otpustiti biološki aktivne upalne citokine i kemokine, poput interleukina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) i IL-33, koji se normalno nalaze i djeluju u stanici. Iako se sve navedene molekule ne smatraju tradicionalno DAMP molekulama, one mogu potaknuti sterilne upalne odgovore (Chen i Nuñez, 2010). DAMP molekule dijele se u pet klasa ovisno o tome kako i na koje receptore se vežu te se u njih ubrajaju tradicionalne DAMP molekule kao i neke molekule koje se ne vežu izravno na stanične receptore ili ih prepoznaju IgM protutijela (Land, 2015a; Land, 2015b). DAMP molekule imaju ulogu u patogenezi različitih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes melitus, Alzheimerova bolest, različiti tumori i kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) (Land, 2015a; Midwood i Piccinini, 2010). DAMP molekule vežu se na receptore za obrasce (PRR, *engl.* pattern recognition receptors) koji aktiviraju prirođeni imunosni odgovor (K. Chen i sur., 2007; Y. Chen i sur., 2007).

### 1.3. RECEPTORI ZA OBRASCE (PRR)

Receptori za obrasce nalaze se na epitelnim i imunosnim stanicama te potiču upalni odgovor nakon što se na njih vežu molekularni obrasci povezani s patogenima (PAMP, *engl.* pathogen-associated molecular pattern) i DAMP-ovi (Bezemer i sur., 2012). Aktivacija PRR-a potiče imunosne odgovore na infekciju i tkivnu ozljedu te otpuštanje citokina i kemokina koji privlače leukocyte na mjesto upale i potiču sazrijevanje antigen-prezentirajućih stanica koje sudjeluju u aktivaciji stečenog imuniteta (Lafferty i sur., 2010). Nastali imunosni odgovor može biti koristan, ali i štetan za domaćina, ovisno o opsegu imunosnih reakcija, njihovu

trajanju te sposobnosti eliminacije patogena, odnosno popravka oštećenog tkiva. Različiti PRR imaju veliku ulogu u regulaciji tkivne homeostaze, zaštiti domaćina te patologiji infektivnih i neinfektivnih plućnih bolesti. PRR obuhvaćaju nekoliko skupina receptora: receptore slične Tollu (TLR, *engl.* Toll-like receptor), lektinske receptore tipa C (CLR, *engl.* C-type lectin receptor), receptore slične oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, *engl.* nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor), receptore krajnjih produkata uznapredovale glikacije (RAGE, *engl.* receptor for advanced glycation end-products) i receptore slične genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (RIG-1R, *engl.* retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor) (Pouwels i sur., 2014; Opitz i sur., 2010) (slika 1.2.).



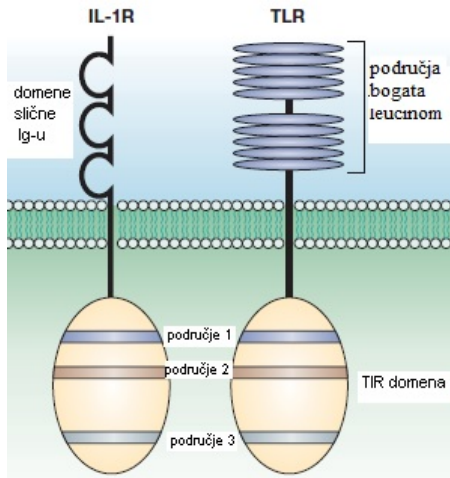
**Slika 1.2.** DAMP molekule mogu se vezati za različite receptore za obrasce i potaknuti sintezu upalnih citokina.

Preuzeto iz: [www.invivogen.com/review-damage-associated-molecular-patterns](http://www.invivogen.com/review-damage-associated-molecular-patterns), 2017.

### 1.3.1. Receptori slični Tollu (TLR)

TLR prepoznaju „signale za opasnost“ i predstavljaju ključnu molekulsku poveznicu između tkivne ozljede, infekcije i upale. Kod ljudi je dosad otkriveno 11 članova TLR porodice receptora, a svi su transmembranski proteini. Mogu se nalaziti unutar stanica u lizosomalnim/endosomalnim membranama (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11) ili na staničnoj membrani (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) (Yarovinsky, 2014; Opitz i

sur., 2010; Takeda, 2004). TLR koji su smješteni na staničnoj membrani prepoznaju uglavnom komponente mikrobnih staničnih stijenki i membrana, a TLR smješteni na lizosomalnim i endosomalnim membranama prepoznaju nukleinske kiseline mikroba (Akira i Takeda, 2004; Takeda i sur., 2003). TLR su receptori tipa 1 integralnih transmembranskih glikoproteina. Svi TLR-ovi imaju konzerviranu receptorsku domenu homolognu Tollu i receptoru za interleukin 1 (TIR, *engl.* Toll/interleukin-1 receptor homology domain), domenu transmembranske uzvojnice i domenu koja sadrži 16-28 područja bogatih leucinom (LRR, *engl.* leucine-rich repeat) oblika potkove. LRR domena je odgovorna za prepoznavanje patogena (Oliveira-Nascimento i sur., 2012; Jin i Lee, 2008). TIR domena TLR-ova neophodna je za signalizaciju i veže se za TIR domenu jedne od adaptacijskih molekula. Vezanje liganda na TLR receptore inducira konformacijsku promjenu u TLR receptoru te dolazi do homo- ili heterodimerizacije. Većina TLR receptora se homodimerizira, a TLR2 stvara heterodimere s TLR1 i TLR6 (Bezemer i sur., 2012; Opitz i sur., 2010; Sarir i sur., 2008). Nastali kompleksi TIR-TIR domena aktiviraju signalna događanja te dolazi do aktivacije različitih transkripcijskih faktora ovisno o adaptacijskoj molekuli. Četiri različite adaptacijske molekule mogu sudjelovati u signalizaciji koju potiču TLR receptori: čimbenik 88 mijeloidne diferencijacije (MyD88, *engl.* myeloid differentiation factor 88), koji također posreduje i u signalizaciji receptora za IL-1 (IL-1R, *engl.* interleukin-1 receptor), adaptacijski protein sličan MyD88/adaptacijski protein s TIR domenom (Mal/TIRAP, *engl.* MyD88 adaptor-like/TIR adaptor protein), adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon  $\beta$  (TRIF, *engl.* TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ ) i adaptacijski protein srodan TRIF-u (TRAM, *engl.* TRIF-related adaptor molecule). Peta adaptacijska molekula je protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (SARM, *engl.* sterile-alpha and Armadillo motif containing protein), a odgovoran je za negativnu regulaciju signalnog puta ovisnog o TRIF-u. Put posredovan MyD88 zajednički je svim TLR-ovima, osim TLR3, a TLR3 i TLR4 mogu aktivirati i put posredovan adaptacijskim proteinom TRIF-om. Put signalizacije posredovan MyD88 proteinom uključuje aktiviranje jezgrinog čimbenika kappa B (NF- $\kappa$ B, *engl.* nuclear factor kappa B) u ranoj fazi pomoću kinaze vezane za IL-1R (IRAK, *engl.* IL-1R associated kinase). U putu signalizacije posredovane TRIF proteinom, adaptacijski protein Mal/TIRAP djeluje kao prenosni protein između MyD88 proteina i TIR domene receptora, dok adaptacijski protein TRAM povezuje TRIF s unutarstaničnom domenom TLR4 (Bezemer i sur., 2012; Lafferty i sur., 2010; Opitz i sur., 2010; Sarir i sur., 2008; Kawai i Akira, 2006; Takeda, 2004; Yamamoto i sur., 2004).



**Slika 1.3.** Prikaz strukturnih domena IL-1R i TLR.

Preuzeto iz: Akira i Takeda, 2004.

TLR mogu prepoznati različite PAMP i DAMP molekule. Postoje brojna istraživanja, uglavnom temeljena na „knockout“ miševima za TLR, koja su utvrdila postojanje velikog broja različitih endogenih i egzogenih liganada za TLR (Takeuchi i Akira, 2010; Chaudhuri i sur., 2005; Travassos i sur., 2004; Iwaki i sur., 2002). TLR2 i TLR4 su receptori za komponente bakterijske stanične stjenke i membrane, pri čemu TLR2 dominantno funkcionira kao receptor za Gram-pozitivne, a TLR4 kao receptor za Gram-negativne bakterije (Takeda i sur., 2003). TLR3, TLR7 i TLR8 važni su u odgovoru na virusne infekcije. TLR3 reagira na dvolančanu virusnu RNA (Alexopoulou i sur., 2001), a TLR7 i TLR8 na jednolančanu virusnu RNA (Heil i sur., 2003). TLR9 prepoznaje citozinsko-gvaninske parove u bakterijskoj DNA te ima važnu ulogu u odgovoru na bolesti dišnih putova jer može mijenjati Th1/Th2 odgovor na antigene (Hemmi i sur., 2000). TLR10 je posljednji otkriven i zasad nema poznatog liganada, a TLR11 prepoznaje flagelin i profilin (Bezemer i sur., 2012). Izvanstanični Hsp70 djeluje na različite vrste stanica, uključujući i stanice prirodnog imunosnog sustava u plućnom tkivu i u krvi, tako da se veže na membranske TLR2 i TLR4 receptore (Bezemer i sur., 2012; Sarir i sur., 2008).

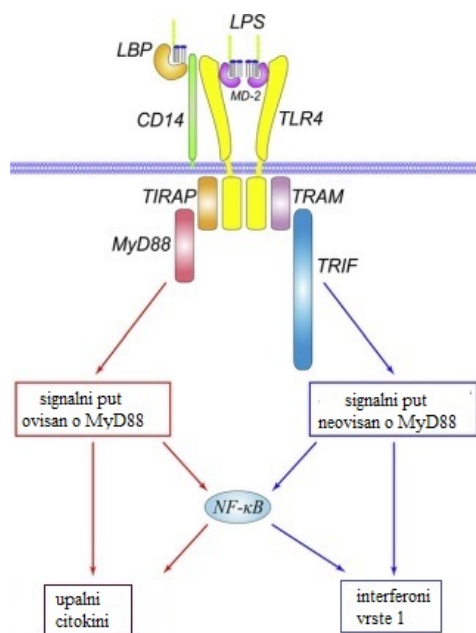
#### **1.3.1.1. TLR2 i TLR4 receptori**

TLR2 i TLR4 su glavni receptori koji prepoznaju različite komponente bakterijske stanične stijenke i membrane. **TLR2** receptori prepoznaju peptidoglikan, lipoproteine i lipoteikoičnu kiselinu (LTA, *engl.* lipoteichoic acid) Gram-pozitivnih bakterija, npr. *Streptococcus pneumoniae* te mikobakterijski lipoarabinomanan. TLR2 receptori također mogu prepoznati neke rijetke vrste lipopolisaharida (LPS), npr. od *Porphyromonas gingivalis* te lipoproteine koji potječu od različitih mikroorganizama uključujući gljivice (*Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, *Aspergillus fumigatus* i *Mycoplasma fermentes*) (Chaudhuri i sur., 2007; Chaudhuri i sur., 2005). Heterodimerizacija TLR2 receptora omogućuje TLR1/2 heterodimeru da prepoznaje drugačije molekule od TLR2/6 heterodimera, čime se proširuje spektar mogućih liganada (Takeda i sur., 2003). Uz to, obzirom da TLR2 ima sposobnost prepoznavanja i komponente koje potječu od gljivica, može se povezati i s različitim tipovima receptora kao što je dektin-1 koji pripada lektinskoj porodici receptora na koju se veže  $\beta$ -glukan, komponenta stanične stijenke gljivica (Takeda i Akira, 2005; Akira i Takeda, 2004).

LTA, ligand TLR2 receptora ispitivan u ovom istraživanju, glavna je strukturna komponenta staničnog zida Gram-pozitivnih bakterija. Njegova struktura razlikuje se između različitih vrsta Gram-pozitivnih bakterija i može sadržavati lanac od ribitol-fosfata ili glicerol-fosfata. LTA je pričvršćen na staničnu membranu bakterije preko diacilglicerola. Uloga LTA u bakteriji je regulacija autolitičkih enzima staničnog zida bakterije (muramidaza). Ima sposobnost stimulacije specifičnog imunosnog odgovora preko heterodimera TLR2/TLR6 uz pomoć molekula CD14 i CD36 koje pomažu u vezanju na receptor (Oliveira-Nascimento i sur., 2012; Cardoso i sur., 2006). LTA aktivira samo put signalizacije posredovan MyD88 proteinom te inducira aktivaciju NF- $\kappa$ B (Ohnishi i sur., 2009; Mitchell i sur., 2007; Schroder i sur., 2006).

**TLR4** receptori prepoznaju Gram-negativne bakterije vezanjem LPS-a, *S. pneumoniae* vezanjem pneumolizina te respiracijski sincicijski virus (RSV, *engl.* respiratory syncytial virus) vezanjem fuzijskog proteina (K. Chen i sur., 2007). TLR4 receptori mogu aktivirati signalizaciju i putem MyD88 i putem TRIF adaptacijskih proteina (Lu i sur., 2008).





**Slika 1.4.** Vezanjem LPS-a na TLR4 receptor pokreće se signalna kaskada koja dovodi do povećane sinteze upalnih citokina i interferona.

Preuzeto iz: Lu i sur., 2008.

Bakterijski endotoksin LPS komponenta je stanične membrane Gram-negativnih bakterija, a sastavni dijelovi su mu oligosaharidna jezgra i O-bočni lanac te lipid A koji je glavni PAMP LPS-a. LPS stimulira stanice domaćina pomoću interakcija s proteinom koji veže LPS (LBP, *engl.* LPS binding protein), CD14, molekulom 2 koja veže lipopolisaharid (MD-2, *engl.* molecule that confers lipopolysaccharide) i TLR4 (Ruiz i sur., 2009; Miyake, 2003; Shimazu i sur., 1999). MD-2, koreceptor TLR4 za LPS, povezan je s izvanstaničnom domenom TLR4 i nužan je za prepoznavanje LPS-a. MD-2 ima hidrofobnu šupljinu koja se izravno veže na lipid A, aktivno središte LPS-a koji je odgovoran za imunostimulirajuće djelovanje (Ohto i sur., 2012; Ohnishi i sur., 2009; Shimazu i sur., 1999). LPS može aktivirati MyD88 ovisan i MyD88 neovisan signalni put preko TRIF adaptacijske molekule, što oboje rezultira transkripcijskom aktivacijom NF-κB (Mollen i sur., 2006).

TLR2 i TLR4 također prepoznaju DAMP molekule kao što su Hsp60 i Hsp70, oslobođene iz stanica pasivnim (nekroza) ili aktivnim putom, oligosaharide hijaluronske kiseline, heparan sulfat i fibrinogen, zatim reaktivne kisikove spojeve (ROS), koji su agonisti TLR2 receptora, te proteine oslobođene iz mrtvih ili umirućih stanica i fragmente nastale kidanjem molekula izvanstaničnog matriksa poput fibronektina, što sve doprinosi razvoju sterilne upale (Mitchell

i sur., 2010; K. Chen i sur., 2007; Y. Chen i sur., 2007; Mollen i sur., 2006; Takeda i Akira, 2005; Tsan i Gao, 2004).

### 1.3.2. Signalizacija TLR receptorima

#### 1.3.2.1. Signalni put ovisan o MyD88 proteinu

TLR se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu, putuju do Golgijeva aparata te se potom prenose do stanične membrane ili unutarstaničnih dijelova gdje obavljaju svoju funkciju. Transmembranski protein UNC93B1 kontrolira putovanje unutarstaničnih TLR receptora od endoplazmatskog retikuluma do endosoma. Kako bi dobili funkcionalni oblik, TLR u endosomu podliježu proteolitičkom kidanju pomoću katepsina B, S, L, H i K te asparginil-endopeptidaze.

Nakon aktivacije TLR MyD88 stvara Myddosom, kompleks s IRAK1 kinazom koja pripada porodici kinaza povezanih s receptorom za IL-1. Tijekom njegovog nastanka, IRAK4 aktivira IRAK1, koji se zatim na nekoliko mjesta samofosforilira i disocira od MyD88. Za kompleks IRAK1/IRAK4 veže se čimbenik 6 povezan s receptorom za čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TRAF6, *engl.* tumor necrosis factor-receptor-associated factor 6) koji potom s enzimima konjugiranim ubikvitinom, UBC13 i UEV1A, potiče poliubikvitinaciju TRAF6 i TAK1 protein-kinaznog kompleksa te kinaze 6 MAPK (MKK6, *engl.* mitogen-activated protein kinase kinase 6).

Kinaza 1 aktivirana transformirajućim čimbenikom rasta  $\beta$  (TAK1, *engl.* transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1) je član porodice kinaza koje aktiviraju kinaze kinaza protein-kinaze aktiviranih mitogena (MAPKKK, *engl.* mitogen-activated protein kinase kinase kinase) i tvori kompleks s regulacijskim podjedinicama proteina koji se vežu na TAK1, TAB1, TAB2 i TAB3 (TAB, *engl.* TAK1-binding protein), koje su u interakciji s poliubikvitinskim lancima nastalim na TRAF6 i dovode do aktivacije TAK1 (Kawasaki i Kawai, 2014). Zatim TAK1 može aktivirati dva različita signalna puta: NF- $\kappa$ B i put protein-kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, *engl.* mitogen-activated protein kinase).

U sisavaca se NF- $\kappa$ B porodica sastoji od pet transkripcijskih faktora p50, p52, p65 (RelA), c-Rel i RelB koji imaju amino-terminalnu domenu homolognu Rel-u (RHD, *engl.* Rel homology domain) koja sudjeluje u vezanju na DNA i u modulaciji ekspresije gena. p65 (RelA), c-Rel i RelB sadrže i C-terminalne domene koje aktiviraju transkripciju (TAD, *engl.* transcriptional activation domains), dok p50 i p52 ne sadrže ove domene te potiskuju

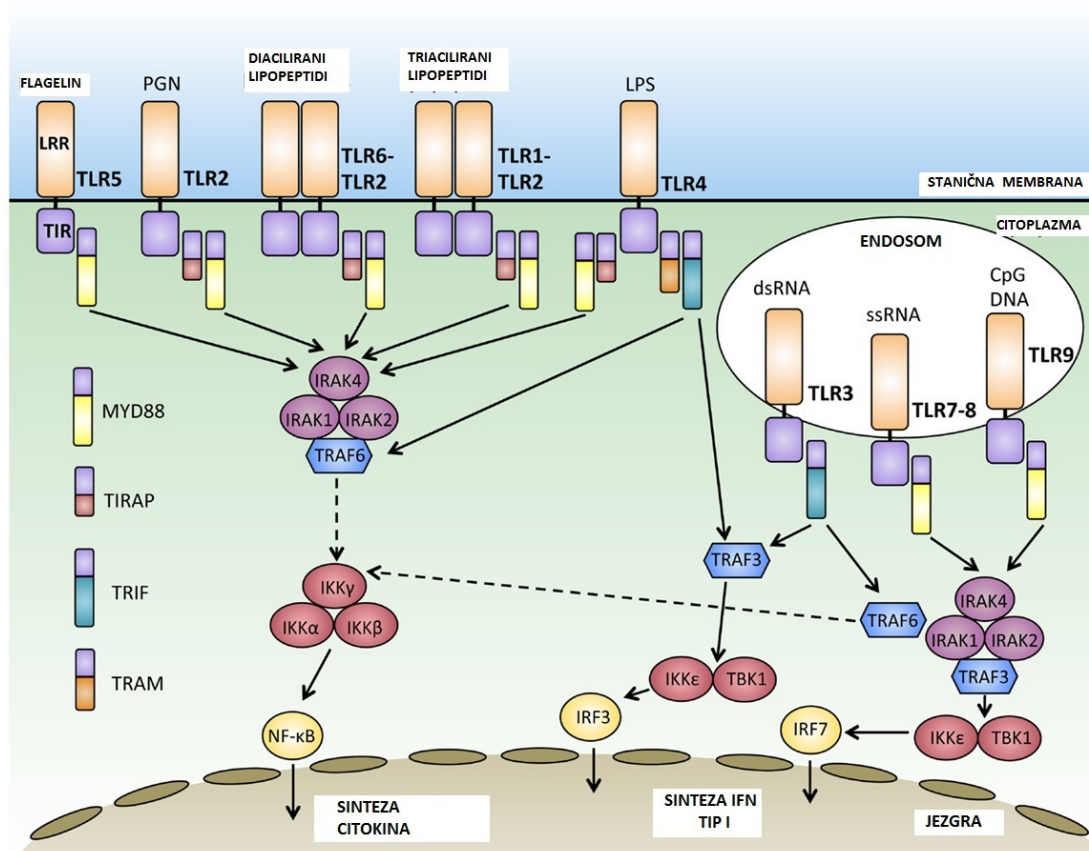
ekspresiju gena osim ako nisu vezani za protein koji sadrži TAD. p50 i p52 nastaju od većih prekursora p100 i p105. NF- $\kappa$ B proteini inhibirani su u citoplazmi inhibicijskim proteinima  $\kappa$ B (I $\kappa$ B, *engl.* inhibitor of  $\kappa$ B) kojih je do sada identificirano sedam (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , Bcl-3, I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , p100 i p105). Poznata su dva puta aktivacije NF- $\kappa$ B, klasični (kanonski) i alternativni (ne-kanonski), a zajednička im je početna aktivacija I $\kappa$ B kinaznog kompleksa (IKK) koji se sastoji od katalitičkih podjedinica IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  te od IKK $\gamma$  regulacijske podjedinice koja se još naziva modulator NF- $\kappa$ B (NEMO, *engl.* NF- $\kappa$ B essential modulator). TAK1 se veže na IKK kompleks preko ubikvitinskih lanaca koji omogućuju fosforilaciju i aktivaciju IKK $\beta$ . IKK kompleks fosforilira inhibicijski protein NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , koji se zatim odvaja od NF- $\kappa$ B i razgrađuje proteasomom, omogućujući tako da se NF- $\kappa$ B translocira u jezgru i inducira ekspresiju upalnih gena. Opisana aktivacija predstavlja klasični put aktivacije gdje dolazi do aktivacije p65 (RelA), c-Rel, RelB i p50, dok u alternativnom putu dolazi do aktivacije p100 i RelB te on sudjeluje u razvoju limfnih organa i B-limfocita (Hoffmann i sur., 2006; Paul N. Moynagh, 2005; Paul N Moynagh, 2005).

Aktivacija TAK1 i MKK6 potiče aktivaciju članova porodice MAPK. Do sada je u sisavaca opisano 5 različitih skupina MAPK, od kojih su najvažnije kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (ERK1/2, *engl.* extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), kinaze koje fosforiliraju N-terminalni dio transkripcijskog faktora c-Jun-a (JNK, *engl.* c-Jun N-terminal kinases) i p38 kinaze. ERK1/2 se aktiviraju putem čimbenika rasta i povezuju se uglavnom s preživljavanjem stanice, proliferacijom i diferencijacijom. Aktivirane ERK1/2 fosforiliraju brojne transkripcijske faktore, primjerice c-Fos i aktivacijski protein 1 (AP-1, *engl.* activator protein 1), koji potiču transkripciju gena važnih za preživljavanje stanice. JNK i p38 kinaze se aktiviraju kao odgovor na stresne podražaje, poput osmotskog šoka, ionizirajućeg zračenja, oksidansa i citokina te su uglavnom odgovorni za poticanje upale i apoptoze. Aktivirane JNK i p38 kinaze fosforiliraju brojne transkripcijske faktore (c-Jun, NF- $\kappa$ B) koji vezanjem za DNA dovode do sinteze upalnih citokina i apoptoznih molekula (Kawasaki i Kawai, 2014; Villena i sur., 2014; Newton i Dixit, 2012; Sarir i sur., 2008; Lu i Xi, 2006; Takeda i Akira, 2005; Roux i Blenis, 2004).

Nedostatak TAK1 u mišjim embrionalnim stanicama fibroblasta dovodi do smanjene fosforilacije IKK, p38 i JNK nakon stimulacije LPS-om. Međutim, aktivacija IKK, p38 i JNK te sinteza citokina potaknuta stimulacijom TLR4 je povišena u neutrofilima tih istih TAK1-deficijentnih miševa, što ukazuje da uloga TAK1 u signalizaciji preko TLR-a ovisi o vrsti stanica (Kawasaki i Kawai, 2014).

### ***1.3.2.2. Signalni put ovisan o TRIF proteinu***

TRIF ulazi u interakciju s TRAF6 i TRAF3. TRAF6 privlači protein-kinazu 1 koja je u interakciji s receptorom (RIP-1, *engl.* receptor-interacting protein 1) te se ona povezuje s TAK1 kompleksom, fosforilira ga i dovodi do njegove aktivacije. Zatim dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih putova te do sinteze citokina. Suprotno tome, TRAF3 privlači kinazu 1 vezanu za aktivator NF- $\kappa$ B koji je povezan s članovima porodice TRAF proteina (TBK1, *engl.* TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) binding kinase 1) i inhibitor kinaznog kompleksa I $\kappa$ B (IKKi, *engl.* inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) te dolazi do fosforilacije čimbenika regulacije interferona (IRF3, *engl.* interferon regulatory factor) pri čemu IRF3 tvori dimer i translocira se iz citoplazme u jezgru, gdje uzrokuje ekspresiju gena za interferon (IFN) tipa I (Kawasaki i Kawai, 2014; Takeda i Akira, 2004). IFN- $\beta$  se veže na tip 1 receptora za interferon (IFNR1), dolazi do aktivacije puta Janus kinaza/prenosioca signala i aktivatora transkripcije (JAK/STAT *engl.* Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) i induciranja ekspresije molekula na površini koje su potrebne za interakciju s T stanicama poput CD40, CD80 i CD86. Aktivacija NF- $\kappa$ B i JAK/STAT signalnog puta također potiče ekspresiju inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS). Dušikov oksid (NO) nastao ovim procesom važan je medijator upale i ima ulogu u uklanjanju mikroba, parazita i malignih stanica (Brieger i sur., 2013).



**Slika 1.5.** Aktivacija TLR kojom dolazi do pokretanja signalne kaskade koja obuhvaća signalne putove ovisne o MyD88 i TRIF proteinu.

Preuzeto iz: Wang i sur., 2014.

#### 1.4. KRONIČNA OPSTRUKCIJSKA PLUĆNA BOLEST

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) definira se kao učestala bolest koju je moguće spriječiti i liječiti, a karakterizirana je perzistentnim respiracijskim simptomima i smanjenjem protoka zraka povezanim s abnormalnostima dišnih putova i/ili alveola koje je obično uzrokovano izlaganjem štetnim česticama i plinovima (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017). Ovo progresivno smanjenje protoka zraka uzrokovano je kombinacijom bolesti malih dišnih putova (kao npr. opstrukcijskog bronhiolitisa) i destrukcije parenhima (emfizema). Kronični upalni odgovor u KOPB-u uzrokuje strukturne promijene koje vode sužavanju dišnih putova, destrukciji parenhima pluća, gubitku alveola i elastičnosti pluća. Ove patološke promijene dovode do ograničenja

protoka zraka te do simptoma karakterističnih za KOPB kao što su dispneja (otežano disanje), kronični kašalj i stvaranje sputuma (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Decramer i sur., 2012).

KOPB je jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u svijetu s prevalencijom od oko 12 % u osoba starijih od 40 godina, a godišnje od posljedica KOPB-a u svijetu umire oko 3 milijuna ljudi (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Kelly i sur., 2013). KOPB također ima i značajne socijalne i ekonomske posljedice, ne samo zbog velikih troškova liječenja, nego i zbog utjecaja na radnu sposobnost bolesnika te njihovu kvalitetu života. Bolest također ima sve veći značaj zbog starenja stanovništva i visokog trenda pušenja u svijetu (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Gibson i sur., 2013).

Pušenje cigareta smatra se jednim od glavnih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a. Većina bolesnika s KOPB-om (oko 80 %) su pušači. Ipak, samo 15-25 % pušača razvije bolest (Roth, 2008). Osim pušenja rizični čimbenici su i izloženost zagađenom zraku, profesionalna izloženost dimu ili prašini, učestale infekcije respiracijskog sustava tijekom djetinjstva, kronična astma, tuberkuloza te loši socioekonomski uvjeti. KOPB je rezultat kumulativne izloženosti rizičnim čimbenicima. Predviđa se da će prevalencija ove bolesti u idućim desetljećima rasti zbog kontinuirane izloženosti rizičnim čimbenicima i starenja svjetske populacije te će KOPB postati jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu. Osim toga važno je naglasiti da je KOPB posljedica interakcija genskih i okolišnih čimbenika te sve osobe istog profila izloženosti okolišnim čimbenicima neće nužno razviti bolest (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Diaz-Guzman i Mannino, 2014; Landis i sur., 2014; Rovina i sur., 2013; Mannino i Kiriz, 2006).

Progresivni tijek KOPB-a pojačavaju egzacerbacije i komorbiditeti, ali i sistemska komponenta bolesti jer se KOPB ne smatra bolešću ograničenom samo na pluća. Sistemske manifestacije bolesti, poput kronične upale, oksidacijskog stresa, aktivacije imunskih stanica, povišene koncentracije upalnih citokina u krvi, kao i komorbiditeti koji uključuju kardiovaskularne poremećaje, metabolički sindrom, disfunkciju mišića, osteoporozu, malnutriciju, anksioznost i depresiju te karcinom pluća, značajno utječu na težinu i kliničku sliku bolesti i smanjuju kvalitetu života bolesnika (Cavailles i sur., 2013; Agusti i Soriano, 2008; Agusti i sur., 2003).

#### 1.4.1. Dijagnoza i klasifikacija KOPB-a

Dijagnoza se postavlja na temelju rezultata spirometrije koja je „zlatni standard“ za dijagnostiku KOPB-a (Agusti i Sin, 2014; Diaz-Guzman i Mannino, 2014). Spirometrija je test funkcije pluća kojim se mjeri količina zraka koju osoba može izdahnuti i vrijeme potrebno da to učini. Mjerenjem se dobivaju vrijednosti parametara potrebnih za postavljanje dijagnoze KOPB-a: forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi ( $FEV_1$ ), forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) i Tiffeneauov indeks, omjer  $FEV_1$  i FVC ( $FEV_1/FVC$ ). Ako je vrijednost  $FEV_1/FVC < 0,70$  nakon primjene bronhodilatatora potvrđuje se dijagnoza KOPB-a (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017).

Globalna inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) temeljem vrijednosti  $FEV_1$  izmjerene nakon primjene bronhodilatatora klasificira bolesnike u četiri skupine prema ograničenju protoka zraka (tablica 1.1.) Vrijednosti  $FEV_1$  nakon testa bronhodilatacije uspoređuju se s predviđenim vrijednostima ovisnima o spolu, dobi, tjelesnoj visini i težini bolesnika (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017). Međutim,  $FEV_1$  slabo korelira sa simptomima i kvalitetom života bolesnika s KOPB-om, a i normalno se smanjuje sa starenjem, pa upotreba  $FEV_1/FVC$  rezultira češćom dijagnozom KOPB-a kod starije populacije. Stoga je predložena upotreba pete percentile donje granične vrijednosti omjera  $FEV_1/FVC$  za odgovarajuću populaciju za dijagnozu KOPB-a te se ovo smatra jednakovrijednim dijagnostičkim parametrom kao i fiksni kriterij  $FEV_1/FVC$  koji se ipak češće koristi (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; M. L. K. Han i sur., 2016; Vestbo, 2014; Nussbaumer-Ochsner i Rabe, 2011).

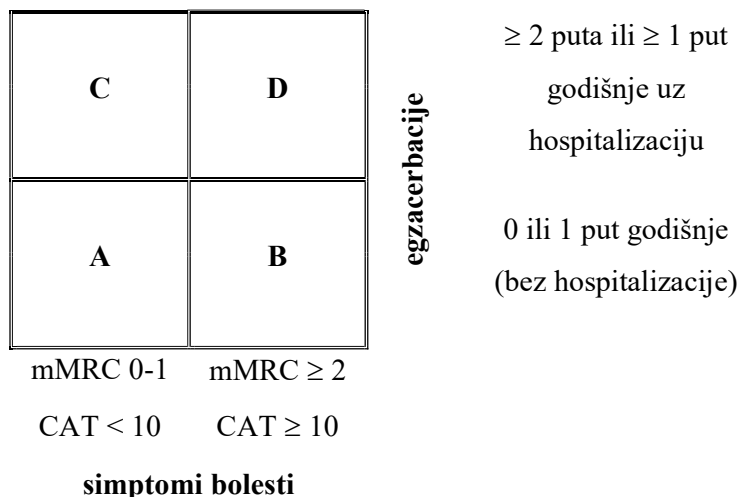
**Tablica 1.1.** Klasifikacija KOPB-a prema GOLD stadijima (GOLD 2017)

Preuzeto iz: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017.

<b>Klasifikacija KOPB-a prema težini opstrukcije dišnih putova s obzirom na FEV<sub>1</sub> nakon primjene bronhodilatatora, FEV<sub>1</sub>/FVC &lt; 0,70</b>		
<b>GOLD I</b>	blaga KOPB	FEV <sub>1</sub> ≥ 80 % predviđenog
<b>GOLD II</b>	umjerena KOPB	50 % ≤ FEV <sub>1</sub> < 80 % predviđenog
<b>GOLD III</b>	teška KOPB	30 % ≤ FEV <sub>1</sub> < 50 % predviđenog
<b>GOLD IV</b>	vrlo teška KOPB	FEV <sub>1</sub> < 30 % predviđenog

Iako je FEV<sub>1</sub> neizostavan kriterij za klasifikaciju KOPB-a, nedovoljan je za karakterizaciju njezine kompleksnosti te ne odražava poremećaje u perifernim dišnim putovima, parenhimu pluća i sistemske učinke bolesti (Agusti, 2014; Agusti i Sin, 2014). Stoga se prema najnovijim GOLD smjernicama procjena težine KOPB-a, osim na rezultatima spirometrije, temelji i na prisutnosti simptoma, riziku od egzacerbacija te prisutnosti komorbiditeta. Težina simptoma procjenjuje se ispunjavanjem izmijenjenog upitnika britanskog medicinskog istraživačkog vijeća (mMRC, *engl.* Modified British Medical Research Council) kojim se procjenjuje smanjenje sposobnosti bolesnika zbog nedostatka zraka ili ispunjavanjem testa za procjenu KOPB-a (CAT, *engl.* COPD Assessment Test) koji uključuje još i utjecaj KOPB-a na svakodnevni život bolesnika. CAT ≥ 10 ukazuje na visoki intenzitet prisutnih simptoma u bolesnika s KOPB-om. mMRC ≥ 2 ukazuje na značajnu zaduhu kod bolesnika (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; M. K. Han i sur., 2016; Agusti i Sin, 2014; Vestbo i sur., 2014). Najbolji prediktor procjene rizika od egzacerbacija je broj prethodnih egzacerbacija, a čestim egzacerbacijama se smatraju više od dvije godišnje. Kombinacijom ovih parametara bolesnici s KOPB-om mogu se svrstati u četiri skupine (A-D) (slika 1.6.).





**Slika 1.6.** Prikaz podjele bolesnika s KOPB-om po skupinama A-D.

Preuzeto iz: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017.

U kliničkoj slici KOPB-a prevladavaju kronični bronhitis i plućni emfizem. **Kronični bronhitis** definiran je pretjeranim lučenjem sluzi u bronhima, koje se očituje ponavljajućim produktivnim kašljem barem tri mjeseca u godini kroz dvije uzastopne godine. Kronični bronhitis rezultat je odgovora imunskog sustava na udahnute štetne čestice i plinove iz zraka (dim cigareta, smog, kemikalije, izgaranje iz peći), a karakteriziran je upalom epitela središnjih dišnih putova i žlijezda koje stvaraju sluz. Ova upala je povezana s pojačanim stvaranjem sluzi, zadebljanjem stijenki bronha, smanjenim uklanjanjem čestica preko cilijarnih stanica te povećanom propusnošću epitelne barijere dišnih putova. Kronično pojačano izlučivanje sluzi doprinosi težini bolesti u kasnijim stadijima kada povećava rizik nastanka egzacerbacija koje mogu ubrzati smanjenje  $FEV_1$  (Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005). **Plućni emfizem** jest bolest u kojoj postoji atomska promjena pluća u obliku abnormalnog proširenja zračnih prostora distalno od krajnjih bronhiola i destrukcija alveolarne stijenke. Javlja se u dva oblika: centrilobularni (centriacilarni) koji nastaje razaranjem alveola smještenih oko bronhiola uključujući proksimalne acinuse, a usko se povezuje s pušenjem cigareta, te panlobularni (panacinarni) koji se povezuje s nedostatkom  $\alpha_1$ -antitripsina, a rezultira razaranjem cijelih acinusa (Fischer i sur., 2011; MacNee, 2009; MacNee, 2005). Posljedica emfizema je slaba izmjena plinova u alveolama i zadržavanje zraka zbog smanjene elastičnosti pluća (Morissette i sur., 2009). Kod bolesnika s KOPB-om mogu se javiti različite značajke kroničnog bronhitisa, emfizema i njihova preklapanja, a

većina bolesnika ima simptome i jednog i drugog poremećaja te opstrukciju dišnih putova (Fischer i sur., 2011).

#### 1.4.2. Čimbenici rizika za KOPB

Najvažniji čimbenik rizika za razvoj KOPB-a je **pušenje** te su oko 80 % oboljelih od KOPB-a pušači (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Yin i sur., 2007; Saetta, 1999; Saetta, 1997). Dim cigareta mješavina je više od 4800 kemijskih komponenti koje uključuju visoke koncentracije slobodnih radikala te oksidansa kao što su reaktivni aldehidi i kinoni koji mogu stvarati hidroksilne radikale i vodikov peroksid. Kronična izloženost dimu cigareta oštećuje epitel dišnih putova što dovodi do aktivacije signalnih kaskada koje potiču otpuštanje upalnih citokina, naročito IL-8, te dolazi do privlačenja upalnih stanica i pojačavanja upalnog odgovora. Također dolazi i do otpuštanja proteolitičkih enzima i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, *engl.* reactive oxygen species) koji uzrokuju dodatna oštećenja ukoliko nisu u ravnoteži s antiproteazama i antioksidansima. Uz to, dim cigareta ograničava proces popravka alveola, što uzrokuje fibrozu. Pušenje remeti i gibanje cilija bronhijalnog epitela i funkciju alveolarnih makrofaga te izaziva hiperplaziju i hipertrofiju vrčastih stanica i submukoznih žlijezda koje luče sluz (Decramer i sur., 2012; Bagloli i sur., 2008; Lada Rumora i sur., 2008; Kode i sur., 2006). Različiti štetni učinci pušenja na zdravlje pluća već su utvrđeni, a danas je poznato da pušenje ima i značajne sistemske učinke, kao što su oksidacijski stres i upala (Faner i sur., 2014; Yanbaeva i sur., 2007). Veća prevalencija simptoma bolesti dišnih putova i abnormalnosti plućne funkcije, veća godišnja razina smanjenja FEV<sub>1</sub> i veća smrtnost od KOPB-a pronađeni su kod pušača u usporedbi s nepušačima (Kohansal i sur., 2009). Pasivno izlaganje dimu cigareta također može pridonijeti pojavi simptoma bolesti dišnih putova i pojavi KOPB-a (Yin i sur., 2007). Prevalencija KOPB-a korelira s rasprostranjenošću pušenja, a dob početka pušenja, intenzitet pušenja i godine pušenja smatraju se prediktorima smrtnosti od KOPB-a (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Vestbo i Lange, 2016; Postma i Rabe, 2015; Godtfredsen i sur., 2008).

Važan čimbenik rizika u KOPB-u je i izloženost drugim **česticama iz zraka** osim dimu cigareta, kao što su organska i anorganska prašina, pare i plinovi na radnom mjestu, smog i ostali vanjski zagađivači zraka, a osobito u zemljama u razvoju bitni su i unutarnji zagađivači zraka poput otvorenih kućnih ložišta, nefunkcionalnih štednjaka te korištenja goriva biološkog

porijekla (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Adeboye i sur., 2015; Vestbo, 2014). KOPB se može pripisati profesionalnoj izloženosti u čak oko 30 % nepušača oboljelih od ove bolesti (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017).

Što se tiče **spola**, prevalencija KOPB-a podjednaka je kod muškaraca i žena zbog sve većeg broja žena među pušačima, a neka istraživanja pokazuju i da su žene osjetljivije na dim cigareta od muškaraca (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Han i sur., 2010).

**Socioekonomski** čimbenici također mogu korelirati s razvojem KOPB-a, naročito u zemljama u razvoju. Loš socioekonomski status podrazumijeva lošiju prehranu, gustu naseljenost, veću zagađenost okoliša, slabiju dostupnost zdravstvene skrbi, veću učestalost respiracijskih infekcija i veću stopu pušenja (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Vestbo, 2014; Mannino i Buist, 2007).

Različiti **genski** čimbenici povezuju se s KOPB-om, od kojih su najbitniji i najbolje istraženi nasljedni nedostatak  $\alpha_1$ -antitripsina, polimorfizmi gena za transformirajući faktor rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , *engl.* transforming growth factor  $\beta$ ), mikrosomalnu epoksid-hidrolazu 1, čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *engl.* tumor necrosis factor  $\alpha$ ), hem-oksigenazu 1, glutation-S-transferazu, metaloproteinaze matriksa (MMP, *engl.* matrix metalloproteinase) 1 i 12 te tkivni inhibitor 2 metaloproteinaze matriksa (TIMP2, *engl.* tissue inhibitor of metalloproteinase). No ipak, dosadašnja istraživanja povezanosti genskih čimbenika i KOPB-a nisu dala dosljedne rezultate (Diaz-Guzman i Mannino, 2014; Molfino, 2007; Wood i Stockley, 2006).

**Ostali** čimbenici rizika za KOPB su svi čimbenici koji utječu na razvoj pluća za vrijeme trudnoće i djetinjstva kao što su niska porođajna težina i respiracijske infekcije. Kronični bronhitis i astma također povećavaju rizik obolijevanja od ove bolesti (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Postma i Rabe, 2015; Diaz-Guzman i Mannino, 2014).

#### 1.4.3. Patogeneza KOPB-a

Smatra se da su patološke promjene u KOPB-u posljedica genske predispozicije i izloženosti rizičnim čimbenicima za razvoj bolesti, posebice dimu cigareta. Razlog tome je povećana osjetljivost nekih osoba na djelovanje štetnih čestica te posljedično javljanje pojačanog i neprimjerenog upalnog odgovora koji dovodi do oštećenja pluća. Osim toga, kronična upala

kod takvih pojedinaca nastavlja se i nakon prestanka pušenja, odnosno prestanka doticaja s drugim štetnim česticama (Rovina i sur., 2013; MacNee, 2005). Osim kronične upale ulogu u nastanku bolesti imaju oksidacijski stres, neravnoteža proteaza i antiproteaza te propadanje alveola apoptozom (Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).

#### **1.4.3.1. Upala**

Kod oboljelih od KOPB-a prisutan je pojačan ili neprimjeren upalni odgovor u dišnim putovima na kronične iritanse kao što je dim cigareta (Hogg i Timens, 2009; MacNee i Calverley, 2003). Upalna reakcija karakterizirana je aktivacijom urođenog (neutrofili, makrofagi, eozinofili, mastociti, stanice prirodne ubojice (NK, *engl.* natural killer cells) i dendritične stanice) i stečenog (T i B limfociti) imunosnog odgovora te je povezana s infiltracijom makrofaga, neutrofila i  $CD8^+$  T limfocita u središnje dišne putove (Fischer i sur., 2011; Roth, 2008; MacNee, 2005). U upalni odgovor uključene su i strukturne stanice, epitelne i endotelne stanice te fibroblasti (Barnes, 2014; Rovina i sur., 2013). Dim cigareta izravno može aktivirati brojne upalne stanice koje onda počnu otpuštati različite upalne, mitogene i fibrozne čimbenike koji stimuliraju ostale stanice na stvaranje dodatnih upalnih čimbenika, dolazi do privlačenja još više imunskih stanica na mjesto upale i posljedično do podržavanja upalnog procesa (Caramori i sur., 2014; Brashier i Kodgule, 2012; Hogg i Timens, 2009) (slika 1.7.).

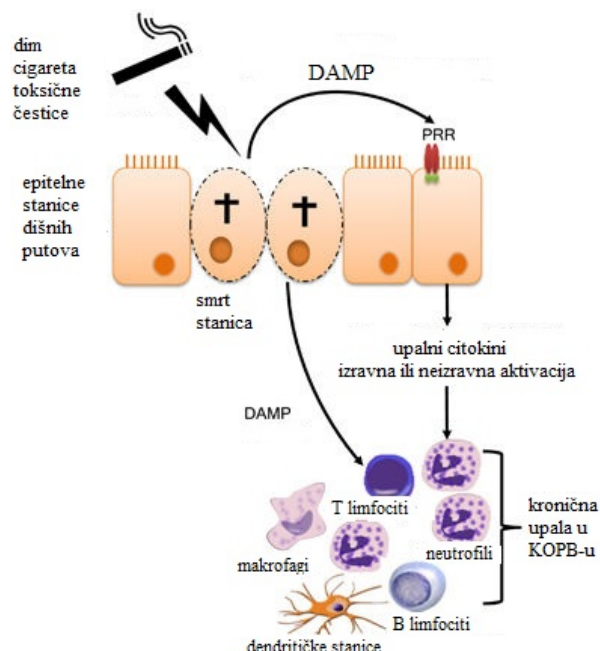
Upalna reakcija u plućima počinje aktivacijom makrofaga te se smatra da upravo oni imaju glavnu ulogu u kroničnoj upali. Njihov broj u dišnim putovima bolesnika s KOPB-om 5-10 je puta veći nego u zdravih ispitanika, a uočena je i korelacija između broja makrofaga i težine bolesti. Makrofagi bolesnika s KOPB-om izlučuju veće količine upalnih proteina i imaju veći početni elastolitički potencijal od makrofaga zdravih pušača, a to je još izraženije nakon izlaganja dimu cigareta. Makrofagi pušača i bolesnika s KOPB-om imaju i produljeni životni vijek, a njihov povećani broj u KOPB-u osim toga je i rezultat povećanog privlačenja monocita iz sistemske cirkulacije i njihove povećane proliferacije (Barnes, 2014; Rovina i sur., 2013; Sarir i sur., 2008; MacNee, 2005). Alveolarni makrofagi monocitnog podrijetla bolesnika s KOPB-om imaju slabiju moć fagocitiranja bakterija, a dim cigareta i druge štetne čestice mogu oslabiti odgovor epitelnih stanica, što bi mogli biti odlučujući čimbenici kronične kolonizacije donjih dišnih putova bakterijama kao što su *Haemophilus influenzae* i *S. pneumoniae* (Barnes, 2014; Glader i sur., 2006). Makrofagi luče različite medijatore upale kao što su  $TNF-\alpha$ , interleukin (IL)-8, IL-6, IL- $1\beta$ , makrofagni upalni protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ,

*engl.* macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), leukotrien B4 (LTB4, *engl.* leukotriene B4), čimbenik poticanja kolonija granulocita/makrofaga (GM-CSF, *engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), stvaraju reaktivne kisikove spojeve i izlučuju proteaze (MMP-2, -9 i -12, katepsine i neutrofilnu elastazu). Stoga makrofagi predstavljaju staničnu poveznicu između pušenja, upalne reakcije i oštećenja tkiva u KOPB-u (Barnes, 2014; Hogg i Timens, 2009; MacNee, 2005). LTB4 i IL-8 izlučeni iz makrofaga privlače neutrofile koji su najvažnije izvršne stanice u upali u KOPB-u, a sintetiziraju i luče proteolitičke enzime kao što su neutrofilna elastaza, katepsini i MMP-ovi te ROS-ove koji izravno oštećuju pluća i pojačavaju izlučivanje mukusa (Roth, 2008). Proteaze, osobito neutrofilna elastaza, potiču sekreciju mukusa iz submukoznih žlijezda i vrčastih stanica epitela što dovodi do poremećaja mukocilijarnog klirensa te posljedično do opstrukcije dišnih putova. Osim toga, proteaze i oksidansi oslobođeni iz aktiviranih neutrofila djeluju elastolitički, a neutrofilni izlučuju i citokine koji u to područje privlače dodatne neutrofile (Barnes, 2014; Brashier i Kodgule, 2012; Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).

U dišnim putovima i sistemske cirkulaciji bolesnika s KOPB-om zabilježen je povećan broj T limfocita, naročito CD8<sup>+</sup> (citotoksičnih) limfocita koji pokazuju povezanost s intenzitetom alveolarnog razaranja i težinom opstrukcije dišnih putova. Limfociti pokreću stečeni imunski odgovor. T limfociti u perifernim dišnim putovima bolesnika s KOPB-om imaju povišenu ekspresiju receptora 3 za kemokine s CXC motivom (CXCR3). Ekspresija proteina od 10 kDa kojeg inducira interferon (IP-10, *engl.* interferon induced protein of 10 kDa), a to je kemokin kojeg veže ovaj CXCR3 receptor, povišena je u bronhijalnim epitelnim stanicama te bi to moglo pridonositi nakupljanju CD8<sup>+</sup> T limfocita. Uz to, citotoksični T limfociti izlučuju perforin, granzim i TNF- $\alpha$  te tako potiču citolizu i apoptozu epitelnih stanica alveola. S druge strane, Th1 subpopulacija pomoćničkih T limfocita izlučuje IFN $\gamma$  i aktivira alveolarne makrofage. Smatra se da limfociti sudjeluju u poticanju upalnog procesa i nakon prestanka pušenja tako da stalno potiču upalne reakcije stvaranjem novih autoantigena tijekom razaranja tkiva pluća ili budući da im je broj obično povišen u plućnim tkivima kod infekcija moguće je da prisutnost kronične virusne ili bakterijske kolonizacije donjeg dišnog sustava u bolesnika s KOPB-om dovodi do njihovog povećanog broja i kronične stimulacije upalnog odgovora (Barnes, 2014; Brashier i Kodgule, 2012; Hogg i Timens, 2009; MacNee, 2005).

U urođenoj imunosti dišnih putova važnu ulogu imaju epitelne stanice. One stvaraju mukus, izlučuju peptide s antimikrobnim djelovanjem, defenzine, sudjeluju u popravku tkiva, izlučuju antiproteaze i antioksidanse. Kao odgovor na oštećenje, epitelne stanice aktiviraju različite zaštitne mehanizme te, kad se aktiviraju, mogu lučiti upalne medijatore IL-1, IL-6, IL-8 i

TNF- $\alpha$ . Također luče TGF- $\beta$  čime potiču fibrozu te su važan izvor ROS-ova. Dim cigareta uzrokuje poremećaj svih navedenih zaštitnih mehanizama i čini pojedinca podložnijim infekciji (Barnes, 2014; Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).



**Slika 1.7.** Mehanizam nastanka kronične upale u KOPB-u.

Preuzeto iz: Pouwels i sur. 2014.

#### 1.4.3.1.1. Citokini u KOPB-u

Citokini su mali proteini koji aktiviraju transkripcijske faktore vezanjem za receptore te tako potiču sintezu novih upalnih medijatora. Stvaraju ih različite stanice (epitelne, endotelne, fibroblasti, makrofagi, monociti, T limfociti), a bitni su u regulaciji upale i stanične smrti (Takeuchi i Akira, 2010; Barnes, 2008; Sarir i sur., 2008; Barnes, 2004). Više različitih citokina povezano je s KOPB-om, a najvažnijima se smatraju TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IL-32 i timusni stromalni limfopoetin (TSLP, *engl.* thymic stromal lymphopoietin) (Agusti i MacNee, 2013; Agusti i Soriano, 2008; Chung, 2001). Povišene koncentracije IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  pronađene su u sputumu bolesnika s KOPB-om, a alveolarni makrofagi pušača i bolesnika s KOPB-om pojačano otpuštaju IL-1, IL-8, IL-10 i TNF- $\alpha$  (Sam i sur., 2000; Keatings i sur., 1996). Također je pokazano da bolesnici s KOPB-om imaju povišene IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u plazmi (Agusti i Sin, 2014; Faner i sur., 2014; Kelly i sur., 2013; Han i sur., 2010; Agusti, 2008; Agusti i Soriano, 2008).

Postoje dva oblika **IL-1**: IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  koji se sintetiziraju kao neaktivne prekursorske molekule. Pro-IL-1 $\beta$  aktivira se nakon proteolitičkog kidanja kaspazom-1, a zreli oblik mora se aktivno izlučiti iz stanice. Kod IL-1 $\alpha$  biološki su aktivni i pro- i zreli oblik. Nakon sinteze, pro-IL-1 $\alpha$  uglavnom ostaje unutar stanice gdje može djelovati poput transkripcijskog faktora, vezati se za DNA i poticati transkripciju gena. Ipak, IL-1 $\alpha$  može djelovati unutar i izvan stanice. Vezanjem pro-IL-1 $\alpha$  ili IL-1 $\alpha$  na receptore potiču se sterilni upalni odgovori te se on može uvrstiti u skupinu DAMP molekula. Za razliku od toga, IL-1 $\beta$  nije DAMP molekula (Dinarello, 2011; Dinarello, 2010; Gabay i sur., 2010; Carta i sur., 2009). IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  najviše se sintetiziraju u monocitima, makrofagima i fibroblastima (Caramori i sur., 2014). U bolesnika s KOPB-om, IL-1 $\beta$  potiče makrofage na otpuštanje upalnih citokina, kemokina i MMP-9 (Culpitt i sur., 2003), a njegova je koncentracija povišena u sputumu bolesnika s KOPB-om te korelira s težinom bolesti, kao i smanjenje koncentracije antagonista IL-1 receptora i topljivog IL-1 receptora (Sapey i sur., 2009). IL-1 $\beta$  potiče leukocitozu tako što povećava otpuštanje neutrofila iz koštane srži, također potiče proliferaciju fibroblasta, otpuštanje prostaglandina i kolagenaza te sintezu fibronektina i kolagena (Chung, 2001).

**IL-6** predstavlja poveznicu prirođenog i stečenog imunosnog odgovora te najčešće djeluje zajedno s drugim citokinima. Njegova je koncentracija povišena u sputumu i plazmi bolesnika s KOPB-om, naročito tijekom egzacerbacija te korelira s koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) (Bucchioni i sur., 2003; Bhowmik i sur., 2000). IL-6 je glavni medijator sinteze CRP-a. Vrlo je stabilan u cirkulaciji (za razliku od ostalih citokina) te se zato smatra da je uključen u sistemske manifestacije KOPB-a, kao i u egzacerbacije. IL-6 može doprinijeti oslabljenoj funkciji endotelnih stanica, inzulinskoj rezistenciji, osteoporozi i depresiji (Barnes, 2009).

**IL-8** ili CXCL8 kemokin ima važnu ulogu u privlačenju neutrofila te u njihovoj aktivaciji, potiče prolaznu promjenu oblika neutrofila, povećanje koncentracije unutarstaničnog kalcija, egzocitozu i otpuštanje enzima iz skladišnih organela unutar stanice te nastanak i otpuštanje ROS-ova. Također regulira povećanje ekspresije integrina CD11b/CD18 i CD11c/CD18 tijekom egzocitoze specifičnih granula, aktivira neutrofilnu 5-lipoksigenazu pri čemu nastaju LTB4 i 5-hidroksi-eikozatetraenska kiselina koji privlače neutrofile u sputum bolesnika s KOPB-om. IL-8 djeluje i kao kemoatraktant za T limfocite. Koncentracija IL-8 u sputumu bolesnika s KOPB-om korelira s prisutnošću bakterija u dišnim putovima, a te bakterije mogu još više potaknuti sintezu IL-8 u epitelnim stanicama. Neutrofilna elastaza također potiče epitelne stanice da sintetiziraju IL-8 i LTB4 (Chung, 2001). Njegova koncentracija je

povišena u sputumu bolesnika s KOPB-om te ona ukazuje na težinu bolesti, a istraživanje s primjenom blokirajućeg protutijela na IL-8 u bolesnika s KOPB-om pokazalo je malo poboljšanje dispneje (Caramori i sur., 2014). Koncentracija IL-8 u sputumu je veća kod bolesnika s deficijencijom  $\alpha_1$ -antitripsina nego kod bolesnika s KOPB-om s normalnom koncentracijom  $\alpha_1$ -antitripsina (Caramori i sur., 2014; Chung i sur., 2009; Woolhouse i sur., 2002; Chung, 2001).

Otpuštanje **TNF- $\alpha$**  potaknuto je drugim citokinima kao što su IL-1, GM-CSF i IFN- $\gamma$ , a njegovim glavnim izvorom smatraju se makrofagi, no stvaraju ga i epitelne stanice, T limfociti i mastociti. TNF- $\alpha$  aktivira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B koji potiče ekspresiju gena za IL-8, čime se on pojačano otpušta iz epitelnih stanica dišnih putova i neutrofila. Koncentracija unutarstanične adhezijske molekule 1 (ICAM-1, *engl.* intracellular adhesion molecule 1) povišena je u serumu bolesnika s KOPB-om, a za to je odgovoran upravo TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  stimulira makrofage na lučenje MMP-ova, no ovaj mehanizam inhibira IL-10. Veliko smanjenje tjelesne mase kod bolesnika s težim oblikom KOPB-a povezuje se s apoptozom stanica skeletnih mišića do koje dolazi upravo zbog povećane koncentracije TNF- $\alpha$  u cirkulaciji (Chung i sur., 2009; Barnes, 2003; Lewis, 2002; Chung, 2001; Locksley i sur., 2001).

#### ***1.4.3.2. Neravnoteža proteaza i antiproteaza***

Važan mehanizam nastanka emfizema u KOPB-u je poremećaj ravnoteže proteaza i antiproteaza koji nastaje zbog pojačanog stvaranja i/ili aktivnosti proteaza te smanjenog stvaranja i/ili inaktivacije antiproteaza. Proteaze uključene u patogenezu KOPB-a stvaraju neutrofili (elastaza, katepsin G, proteinaza 3) i makrofagi (katepsini B, L i S te MMP-ovi). Smatra se da važnu ulogu u patogenezi KOPB-a imaju  $\alpha_1$ -antitripsin, sekrecijski inhibitor leukoproteinaza i TIMP-ovi (Fischer i sur., 2011; Abboud i Vimalanathan, 2008; Kim, Liu, Kohyama, i sur., 2004). Poremećaj ravnoteže ovih molekula uzrokovan je ROS-om, a dim cigareta može inaktivirati antiproteaze ili uzrokovati privlačenje upalnih stanica u pluća i tako povećati sintezu proteaza. One se onda međusobno aktiviraju ili inaktiviraju antiproteaze te stimuliraju razgradnju komponenti izvanstaničnog matriksa, poput elastina i kolagena, pri čemu nastaju fragmenti elastina i peptidi porijeklom iz kolagena koji djeluju kemotaktično na monocite i neutrofile te tako potiču njihovo daljnje nakupljanje i oštećenje pluća (Barnes, 2014; Fischer i sur., 2011; O'Reilly i sur., 2009; Demedts i sur., 2006; MacNee, 2005).



U bronhoalveolarnom ispirku bolesnika s KOPB-om koncentracija neutrofilne elastaze korelira sa stupnjem emfizema (Fujita i Nakanishi, 2007), a u tkivu pluća oboljelih od KOPB-a povećana je koncentracija MMP-1, MMP-2, MMP-8 i MMP-9 te ona korelira s funkcijom pluća (Babusyte i sur., 2007; Segura-Valdez i sur., 2000). Alveolarni makrofagi bolesnika s KOPB-om *in vitro* otpuštaju manje TIMP-1 nego makrofagi pušača i nepušača (Pons i sur., 2005), što podupire teoriju neravnoteže proteaza i antiproteaza u patogenezi KOPB-a.

#### **1.4.3.3. Oksidacijski stres**

Oksidacijski stres stanje je neravnoteže između oksidansa i antioksidansa u organizmu. Ima važnu ulogu u patogenezi KOPB-a jer dovodi do oštećenja plućnih struktura, a osim toga i pojačava ostale mehanizme uključene u patogenezu ove bolesti (Cavalcante i de Bruin, 2009). Glavni endogeni izvori reaktivnih spojeva u dišnom sustavu su alveolarni makrofagi, epitelne i endotelne stanice te imunosne stanice (neutrofili, eozinofili, monociti i limfociti), dok su glavni egzogeni izvori dim cigareta i ostali zagađivači (Cavalcante i de Bruin, 2009). Oksidacijski stres pridonosi patogenezi KOPB-a inaktivacijom antiproteaza, poticanjem ozljeda epitela dišnih putova i apoptoze, povećanim nakupljanjem neutrofilnih granulocita u mikrovaskulaturi pluća i pojačanom ekspresijom gena za upalne medijatore (MacNee, 2009; MacNee, 2005). Različiti pokazatelji oksidacijskog stresa nađeni su u povećanim količinama u plućima, kondenzatu izdahnutog zraka, mokraći i krvi pušača i bolesnika s KOPB-om (produkti lipidne peroksidacije (4-hidroksi-2-nonenal (HNE), malondialdehid (MDA), F<sub>2</sub>-izoprostan), NO, vodikov peroksid) (Milevoj Kopčinović i sur., 2016; Kulikowska-Karpinska i Czerw, 2015; Wu i sur., 2004). Oksidacijski stres ima ulogu u pojačavanju upale kod pušača i bolesnika s KOPB-om aktivacijom redoks-osjetljivih transkripcijskih faktora kao što su NF- $\kappa$ B i AP-1 koji sudjeluju u sintezi upalnih medijatora (Barnes, 2014; Cavalcante i de Bruin, 2009; Rahman, 2006; Rahman i Adcock, 2006; MacNee, 2005).

#### **1.4.3.4. Apoptoza**

Apoptoza je programirana smrt stanice koja omogućuje uklanjanje neželjenih, oštećenih ili zaraženih stanica. Ključna je za održavanje homeostaze tkiva te je u ravnoteži s proliferacijom i diferencijacijom stanica. Poremećaj mehanizama apoptoze i popravka strukturnih stanica pluća pod utjecajem dima cigareta jedan je od glavnih mehanizama u patogenezi KOPB-a (Kang i Shadel, 2016). Apoptoza epitelnih i endotelnih stanica pluća, u kombinaciji s

gubitkom proliferacije ovih stanica, dovodi do razaranja plućnog tkiva u bolesnika s KOPB-om (Demedts i sur., 2006).

Apoptoza je precizno regulirani proces, a molekule koje se specifično aktiviraju u procesu apoptoze nazivaju se kaspaze (*engl.* caspase, kratica od cysteine-dependent aspartate-specific protease). Kaspaze koje sudjeluju u apoptozi mogu se podijeliti u dvije skupine, inicijacijske kaspaze, kaspaze -8, -9 i -10 koje odgovaraju na apoptozni poticaj, te izvršne kaspaze -3, -6 i -7 koje proteolitički kidaju supstrate i tako doprinose apoptoznom fenotipu (Nicholson, 2000). Postoje dva mehanizma apoptoze: vanjski put apoptoze ili put receptora smrti i unutarnji ili mitohondrijski put apoptoze. Vanjski put apoptoze ili put receptora smrti aktivira se kao odgovor na izvanstanične signale, a posredovan je vezanjem Fas liganda, TNF- $\alpha$  ili liganda sličnog TNF-u koji potiče apoptozu (TRAIL, *engl.* TNF-related apoptosis-inducing ligand) na receptore stanične smrti (Fas, TNFR ili TRAIL-R1/2) na površini stanice, što rezultira povezivanjem receptora smrti i stvaranjem signalnog kompleksa koji potiče smrt (DISC, *engl.* death inducing signaling complex). DISC sadrži adaptacijske molekule poput proteina koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (FADD, *engl.* Fas-associated death domain) koji aktivira kaspaze-8/10, a koje dalje aktiviraju kaspazu-3. Kaspaza-3 oslobađa DNazu aktiviranu kaspazama (CAD, *engl.* caspase-activated DNase) od inhibitora CAD-a (ICAD, *engl.* inhibitor of CAD) te dolazi do fragmentacije DNA. Kaspaze-8/10 mogu pokidati Bid, protein iz porodice Bcl-2 proteina koji stvara heterodimere s Bax i Bak apoptoznim proteinima (iz iste Bcl-2 porodice), te se ovi heterodimeri uklapaju u vanjsku membranu mitohondrija i uzrokuju oslobađanje citokroma c. Unutarnji ili mitohondrijski put apoptoze nastaje kao odgovor na fizikalne ili kemijske stresne signale i uključuje otpuštanje citokroma c iz mitohondrija. Citokrom c s čimbenikom 1 koji aktivira apoptozne proteaze (Apaf-1, *engl.* apoptotic protease activating factor-1), (d)ATP-om i pro-kaspazom-9 čini apoptosom, što rezultira aktivacijom kaspaze-9 koja onda aktivira kaspazu-3. Tijekom apoptoze dolazi do fragmentacije kromosomske DNA, kondenzacije kromatina i raspada jezgre u manje dijelove. Na kraju se i sama stanica fragmentira u dijelove okružene membranom (apoptozna tjelešca) koje prepoznaju makrofagi i uklanjaju ih fagocitozom (Morissette i sur., 2009; Demedts i sur., 2006).

Istraživanja na uzorcima tkiva pluća bolesnika s KOPB-om pokazala su značajno veći broj stanica (epitelnih, endotelnih, neutrofila, limfocita) u apoptozi u odnosu na zdrave ispitanike (Calabrese i sur., 2005; Imai i sur., 2005; Yokohori i sur., 2004; Kasahara i sur., 2000; Segura-Valdez i sur., 2000). Apoptoza stanica pluća kao odgovor na dim cigareta povezuje se s manjkom vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, *engl.* vascular endothelial

growth factor) i njegovog receptora 2 (VEGFR-2, engl. VEGF receptor 2) čija je ekspresija snižena u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika s KOPB-om, s oštećenjima uzrokovanim oksidacijskim stresom i posljedičnom upalom te s neravnotežom proteaza i antiproteaza (Morissette i sur., 2009; Demedts i sur., 2006).

#### **1.4.4. Sistemska upala u KOPB-u**

Sistemska komponentu KOPB-a karakteriziraju kronična upala, oksidacijski stres, aktivacija imunskih stanica i povišena koncentracija upalnih citokina u krvi (Faner i sur., 2014; Agusti, 2008; Agusti i Soriano, 2008; Agusti i sur., 2003).

Dim cigareta, kao najvažniji rizični čimbenik za razvoj KOPB-a, osim upale u dišnim putovima uzrokuje i sistemske učinke, prvenstveno sistemska upala, te se pušenje smatra poveznicom između plućne i sistemske upale u KOPB-u, a pušenje također pridonosi i nastanku komorbiditeta (Cavailles i sur., 2013; Müllerova i sur., 2013; Nussbaumer-Ochsner i Rabe, 2011; Agusti, 2008; Donner i ZuWallack, 2008; Yanbaeva i sur., 2007). U krvi bolesnika s KOPB-om opažene su povišene koncentracije nekih upalnih parametara kao što su CRP, fibrinogen, leukociti i upalni citokini IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ , što ukazuje na perzistirajuću sistemska upala niskog intenziteta. Istraživanja su pokazala da 16 % bolesnika s KOPB-om ima trajno prisutan "sistemski inflamom", odnosno povišene vrijednosti navedenih upalnih parametara, dok on nije prisutan kod 30 % bolesnika. Također se pokazalo da su koncentracije upalnih parametara obrnuto proporcionalne vrijednostima spirometrijskih parametara, neovisno o spolu, dobi, indeksu tjelesne mase i intenzitetu pušenja, a sistemska upala dokazana je i u nepušača s prisutnim ograničenjem protoka zraka (Agusti i Sin, 2014; Phaner i sur., 2014; Agusti i sur., 2013; Phaner i sur., 2013; Agusti i sur., 2012; Garcia-Aymerich i sur., 2010; Han i sur., 2010).

Postoje dvije hipoteze o nastanku sistemske upale; „prelijevanje“ upalnih medijatora iz pluća u sistemska cirkulaciju te obratni mehanizam gdje se smatra da je sistemska upala ona komponenta KOPB-a koja uzrokuje poremećaje u plućima, a njezino porijeklo je u sistemskim učincima pušenja, hipoksiji tkiva, poremećenoj funkciji skeletnih mišića, stimulaciji koštane srži, imunskim poremećajima i infekcijama. Ipak, najvjerojatnije je da brojni različiti čimbenici uzrokuju sistemska upala (Agusti i sur., 2012; Agusti, 2008; Agusti i Soriano, 2008).

#### 1.4.5. Egzacerbacije KOPB-a

Egzacerbacije KOPB-a predstavljaju akutno pogoršanje respiracijskih simptoma bolesti koje stvara potrebu za dodatnom terapijom, a karakterizirane su pojačanom upalom, povećanim stvaranjem sputuma, pojačanim kašljem i pogoršanom dispnejom. Najčešći uzrok egzacerbacija su virusne ili bakterijske infekcije dišnog sustava, dok dim cigareta ili zagađenje zraka također mogu pridonijeti razvoju egzacerbacija. One mogu biti životno ugrožavajuće, osobito u bolesnika s uznapređovalom bolešću (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; O'Donnell, 2011; White, 2005). Postoje dokazi da su egzacerbacije povezane s povećanim brojem eozinofila u sputumu, tkivima pluća i krvi bolesnika s KOPB-om, a broj eozinofila, neutrofila i drugih upalnih stanica povećava se tijekom egzacerbacija te doprinosi pogoršanju upale (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Groenke i Disse, 2015; Bafadhel i sur., 2011).

#### 1.4.6. Hsp70 i KOPB

Uloga Hsp70 u KOPB-u nije detaljno razjašnjena, no uloga unutarstaničnog Hsp70 istražena je bolje nego izvanstaničnog. Pokazno je da dim cigareta potiče sintezu Hsp70 proteina u monocitima, fibroblastima i 16HBE stanicama kultiviranim *in vitro* (Pouwels i sur., 2014; Dong i sur., 2013; C.-J. Li i sur., 2007). Istraživanja na različitim stanicama bolesnika s KOPB-om pokazala su sniženu ekspresiju Hsp70 u leukocitima, limfocitima i alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om ovisnu o pušačkom statusu, koja je vjerojatno nastala zbog potisnute transkripcije ili povećanog otpuštanja iz stanica (L. Rumora i sur., 2008; J i sur., 2005; Maestrelli i sur., 2003). Suprotno tome, u plućnim epitelnim stanicama bolesnika s KOPB-om pronađena je povišena ekspresija Hsp70 koja je korelirala s težinom bolesti (Dong i sur., 2013).

Hacker i sur. pronašli su povišene koncentracije Hsp70 u serumu bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave osobe (Hacker i sur., 2009). Cui i sur. istraživali su koncentracije Hsp70 u plazmi rudara u ugljenokopima. Rudari s KOPB-om su imali značajno više koncentracije Hsp70 u plazmi od zdravih rudara, a u skupini rudara s KOPB-om i pneumokoniozom koncentracije su bile više u odnosu na zdrave rudare i rudare s KOPB-om, ali bez pneumokonioze (Cui i sur., 2015).

#### 1.4.7. TLR2, TLR4 i KOPB

KOPB i pušenje djeluju na ekspresiju TLR receptora i na signalne putove koje oni potiču. TLR2 i TLR4 se smatraju glavnim TLR-ovima odgovornim za održavanje upalne reakcije u KOPB-u (Zuo i sur., 2015). Izloženost dimu cigareta izravno aktivira TLR4 u mišjim i ljudskim stanicama, a može i uzrokovati otpuštanje DAMP-ova koji uzrokuju daljnju aktivaciju TLR4 (Opitz i sur., 2010). LPS se veže za TLR4, povećava njegovu ekspresiju te aktivira monocite i makrofage. Tako stimulira otpuštanje MMP-ova koji su važni u razvoju KOPB-a. Interakcije između monocita i glatkih mišićnih stanica mogu rezultirati otpuštanjem razgradnih produkta matriksa te pridonijeti konstantnoj aktivaciji TLR4 receptora (Chaudhuri i sur., 2007; Chaudhuri i sur., 2005; Muzio i sur., 2000). Kad je prisutna infekcija, epitelne stanice dišnih putova mogu pojačati ekspresiju TLR receptora, što je bitno tijekom egzacerbacija KOPB-a. Mali broj monocita na kojima su aktivirani TLR receptori mogu uzrokovati otpuštanje velikih koncentracija citokina iz stanica glatkih mišića dišnih putova. Stoga je lako razumljivo zašto su ovakve interakcije bitne u nastanku upale u KOPB-u (Chaudhuri i sur., 2005). Pojačana osjetljivost dišnih putova na ozon povezuje se upravo s TLR4 receptorima, no nije uočena povezanost TLR4 polimorfizama sa stadijima KOPB-a (Sabroe i sur., 2008; Sabroe i sur., 2003). Upala koju izaziva dim cigareta nije prisutna u „knockout“ miševa za TLR2 i TLR4, pri čemu TLR2 najvjerojatnije sudjeluje u ranoj fazi upale koju izazivaju oksidansi, dok bi TLR4 mogao biti uključen u kasnijoj fazi (Mitchell i sur., 2010). Ekspresija TLR2 povišena je u monocitima iz periferne krvi bolesnika s KOPB-om u odnosu na nepušače i pušače s normalnom funkcijom pluća (Pons i sur., 2006) dok je u alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om i zdravih pušača opažena snižena ekspresija TLR2 (Droemann i sur., 2005). Ekspresija TLR4 snižena je epitelnim stanicama nosa pušača i bolesnika s težim stadijima KOPB-a u odnosu na zdrave nepušače i bolesnike s blažim stadijima KOPB-a (MacRedmond i sur., 2007). Snažna i/ili kronična stimulacija TLR receptora PAMP-ovima, DAMP-ovima i inhaliranim česticama dovodi do remodeliranja i propadanje plućnog parenhima koje potencijalno uzrokuje razaranje stijenki alveola, odnosno emfizem pluća (Opitz i sur., 2010).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Proteini toplinskog šoka ili stresni proteini unutarstanični su proteini koji pripomažu pravilnom naboranju novosintetiziranih te oštećenih i denaturiranih proteina, stabilizaciji i sprječavanju agregacije proteina. Koncentracija Hsp može se povećati u različitim stanjima fiziološkog i okolišnog stresa kao što su infekcije, upala, ozljede ili toplina. Neki Hsp, poput inducibilnog Hsp70 molekulske mase 72 kDa, mogu se izlučiti u izvanstanični prostor te tada djelovati kao DAMP molekule, odnosno kao „signali za opasnost“ za imunski sustav. Izvanstanični Hsp70 posjeduje šaperonsku i citokinsku aktivnost (šaperokin) te može stimulirati imunsko-upalni odgovor koji dovodi do pojačane sinteze i izlučivanja upalnih citokina. Izvanstanični Hsp70 ovakva imunostimulirajuća djelovanja vrši vezanjem na TLR2 i TLR4 receptore, što dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih putova. Smatra se da niže koncentracije eHsp70 mogu djelovati zaštitno i biti dio normalnog odgovora na infekciju ili stres, a nakon što se prekorači određeni kritični koncentracijski prag eHsp70 može potencirati abnormalnu upalnu reakciju te je *in vivo* funkcija eHsp70 ovisna o kontekstu. U bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolešću izmjerene su povišene koncentracije eHsp70 u krvi.

KOPB jedan je od vodećih uzroka morbiditeta i smrtnosti u svijetu s prevalencijom od oko 12 % kod osoba starijih od 40 godina, a jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj bolesti je pušenje. KOPB karakterizira progresivno ograničenje protoka zraka povezano s pojačanim kroničnim upalnim odgovorom u dišnim putovima i plućima na štetne čestice ili plinove, najčešće dim cigarete. Egzacerbacije i komorbiditeti pridonose ukupnoj težini kliničke slike pojedinih bolesnika. Bolesnici s KOPB-om razvijaju abnormalne upalne reakcije, a kronična upala može dovesti do uništenja parenhima pluća (emfizema) i kroničnog bronhitisa. Osim plućnih manifestacija, KOPB također ima sistemsku komponentu koju karakterizira kronična upala, oksidacijski stres, aktivacija imunskih stanica i povišena koncentracija upalnih citokina u krvi. Bolesnici s KOPB-om su osjetljivi na povremene bakterijske kolonizacije i infekcije koje mogu dovesti do egzacerbacija i pogoršanja već aktivne upale.

**Glavna hipoteza** ovog istraživanja je da izvanstanični protein Hsp70 može aktivirati imunsko-upalni odgovor u KOPB-u, ali da može i modulirati upalni odgovor izazvan patogenim bakterijama ili dimom cigareta kojima su često izložene osobe oboljele od ove bolesti.

**Cilj** istraživanja ispitati je ulogu i mehanizam djelovanja izvanstaničnog proteina Hsp70 i njegovih receptora TLR2 i TLR4 na stanicama plućne i sistemske komponente KOPB-a.

Za ispitivanja **plućne komponente** KOPB-a korištene su stanična linija bronhijalnih epitelnih stanica NCI-H292 i primarne traheobronhijalne epitelne stanice, a za ispitivanje **sistemske komponente** KOPB-a stanična linija monocitno-makrofagnih stanica THP-1 i primarni monociti iz periferne krvi.

**Hipoteza i ciljevi** istraživanja ispitani su pod utjecajem **izvanstaničnog proteina Hsp70**, uz **kombinirana** tretiranja bakterijskim komponentama **LPS-om** i **LTA** te uz kombinirana tretiranja **ekstraktom dima cigareta**.

Specifični ciljevi:

- I.** odrediti koncentraciju upalnih citokina izlučenih iz stanica (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) pod utjecajem **izvanstaničnog proteina Hsp70**, uz **kombinirana** tretiranja bakterijskim komponentama **LPS-om** i **LTA** te uz kombinirana tretiranja **ekstraktom dima cigareta**;
- II.** ispitati aktivaciju membranskih TLR2 i TLR4 receptora određivanjem signalnih molekula MAPK (ERK, JNK i p38) i NF- $\kappa$ B koje su važne za indukciju sinteze upalnih citokina;
- III.** razjasniti funkcionalno značenje aktivacije TLR te NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih putova korištenjem općih inhibitora transkripcije i translacije (aktinomicin D i cikloheksimid) te specifičnih farmakoloških inhibitora signalnih molekula (inhibitori ERK, JNK i p38 MAPK, inhibitor NF- $\kappa$ B puta);
- IV.** ispitati vijabilnost stanica (MTS test, mjerenje aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH)) te načine umiranja stanica (određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9).



### **3. MATERIJALI I METODE**

Istraživanje uloge izvanstaničnog proteina Hsp70 u KOPB-u bit će podijeljeno na dva dijela:

1. *in vitro* istraživanje plućne komponente KOPB-a koristeći:

- staničnu liniju epitelnih stanica traheobronhijalnog trakta NCI-H292 (humane bronhijalne epitelne stanice porijeklom od bolesnika s mukoepidermalnim karcinomom);
- primarne humane traheobronhijalne epitelne stanice (NHBE - normalne humane bronhijalne epitelne stanice, PBEC - primarne traheobronhijalne epitelne stanice izolirane od zdravih ispitanika te od bolesnika s KOPB-om (PBEC KOPB));

2. *in vitro* istraživanje sistemske komponente KOPB-a koristeći:

- staničnu liniju monocitnih stanica THP-1 (humani monociti iz periferne krvi porijeklom od bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom);
- primarne humane monocite iz periferne krvi.

### **3.1. Kultura stanica**

#### **3.1.1. Stanične linije**

**NCI-H292** (American Type Culture Collection, SAD) su stanice mukoepidermalnog plućnog karcinoma originalno izolirane iz metastaze u limfnom čvoru 32-godišnje bolesnice. Stanice su epitelnog tipa te adheriraju na podlogu. Konstitutivno ekspimiraju mRNA za TLR1 - 10 (Hou i sur., 2006).

**THP-1** (American Type Culture Collection, SAD) su stanice akutne monocitne leukemije originalno izolirane iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta. Stanice su u suspenziji i rastu u manjim grudama (Tsuchiya i sur., 1980).

Stanice su uzgajane u bocama za uzgoj staničnih kultura (25 cm<sup>2</sup> ili 75 cm<sup>2</sup>) s odgovarajućim volumenom kompletnog RPMI medija u inkubatoru (Hera Cell, Kendro Laboratory Products, Njemačka) na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Kompletni RPMI medij sadrži RPMI-1640 s L-glutaminom i HEPES-om (Lonza Group Ltd, Švicarska ili Capricorn, UK) uz dodatak 0,6 mM piruvata (Fluka, Švicarska), 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS, *engl.* fetal bovine serum) (South American Origin, Biosera, USA ili Capricorn, UK) i 1 % 100 puta koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (10000 U/ml penicilina, 10 mg/ml streptomicina, 25 µg/ml amfotericina B) (Lonza Group Ltd, Švicarska). NCI-H292 stanice kultivirane su do oko 80–90 % konfluentnosti što je kontrolirano invertnim mikroskopom

(Diavert, Leitz, Njemačka) te nakon toga presađene. THP-1 stanice koje rastu u suspenziji razrjeđuju se 1-2 puta tjedno.

THP-1 stanice su u svim ispitivanjima provedenim u ovom radu prije tretiranja diferencirane u makrofage tijekom 48 sati pomoću 20 nM forbol 12-miristat-13-acetata (PMA).

### 3.1.2. Primarne stanice

Normalne humane bronhijalne epitelne stanice (**NHBE**) izolirane su iz epitela dišnih putova iznad bifurkacije traheje zdravih ispitanika (Lonza Group Ltd., Švicarska). **PBEC** stanice izolirane su iz trahealnog tkiva ostalog nakon transplantacije pluća (stanice od zdravih donora), a **PBEC KOPB** stanice dobivene su iz bronhijalnih brisova bolesnika s KOPB-om. PBEC i PBEC KOPB stanice dobivene su i korištene u Experimental Pulomonology and Inflammation Research (EXPIRE) laboratoriju, University Medical Center Groningen, Nizozemska.

Sve navedene primarne humane bronhijalne epitelne stanice uzgajaju se u BEGM mediju (Lonza Group Ltd., Švicarska), u bocama za uzgoj staničnih kultura prethodno obloženima 0,1 % fibronektinom (Sigma-Aldrich, SAD) i 3 mg/ml kolagenom (Inamed, SAD) te se odmah nakon postignute konfluentnosti od oko 90 % nasađuju na odgovarajuće ploče s 24 ili 96 jažica koje su također obložene na isti način kao i boce za uzgoj staničnih kultura.

**Monociti** su izolirani od zdravih ispitanika metodom razdvajanja magnetskim česticama obilježenim s CD14 (Miltenyi Biotec, Njemačka).

Monociti porijeklom iz periferne krvi su u svim ispitivanjima provedenim u ovom radu prije tretiranja diferencirani u makrofage tijekom 7 dana pomoću 25 ng/ml čimbenika koji stimulira rast makrofagnih kolonija (M-CSF, *engl.* macrophage colony stimulating factor) u kompletnom RPMI mediju uz dodatak 1 % neesencijalnih aminokiselina (Lonza Group Ltd., Švicarska) i 1 % piruvata (Lonza Group Ltd., Švicarska) tijekom 7 dana.

### 3.2. Presađivanje stanica

NCI-H292 stanice presađuju se kad postignu oko 80-90 % konfluentnosti. Kompletni RPMI medij iznad adherentnih stanica ukloni se vakuum sisaljkom. Stanice se isperu 2 puta s 1 ili 5 ml 0,38 mg/ml otopine EDTA (Sigma-AldrichCo., USA), ovisno o veličini boce za uzgoj stanica, kako bi se uklonili ostaci seruma koji sadrži  $\alpha$ 1-antitripsin koji bi mogao inhibirati djelovanje tripsina u sljedećem koraku. Otopina EDTA se ukloni vakuum sisaljkom i doda se 1 ili 3 ml 0,25 % otopine tripsin-EDTA (Sigma-AldrichCo., USA) kako bi se stanice odvojile

od podloge. Nakon 5 minuta inkubacije na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>, na stanice se doda 3 ili 5 ml kompletnog RPMI medija koji zaustavlja djelovanje tripsina te se stanice resuspendiraju pipetom. Stanična suspenzija prenese se u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira (Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka) 5 minuta na 200 g pri sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica resuspendira u 1 ml kompletnog RPMI medija. Najprije se odredi broj stanica u suspenziji, a zatim se određeni volumen suspenzije stanica nasadi u novu bocu za uzgoj staničnih kultura u koju je prethodno stavljen određeni volumen kompletnog RPMI medija. Stanice se najčešće razrjeđuju u omjeru 1:3-1:8. Boca se nakon presađivanja spremi u inkubator na 37 °C, pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>.

THP-1 stanice razrjeđuju se s kompletnim RPMI medijem na gustoću 0,2-0,4x10<sup>6</sup> stanica/ml na način da se uzme 1-2 ml stanica i 4-5 ml novog medija za uzgoj u boci od 25 cm<sup>2</sup>, odnosno da se uzme 3-5 ml stanica i 10-12 ml novog medija za uzgoj u boci od 75 cm<sup>2</sup>. Brojanje stanica vrši se otprilike svakih 10 dana, tako da se stanice centrifugiraju (Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka) 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi, medij se ukloni vakuum sisaljkom te se stanice resuspendiraju u 1 ml medija za uzgoj stanica. Nakon toga se stanice izbroje u Neubauerovoj komorici s tripanskim plavilom nakon čega im se u potpunosti promijeni medij, a volumen dodanog medija ovisi o željenoj gustoći stanica.

Primarne humane bronhijalne epitelne stanice nakon što postignu oko 90 % konfluentnosti nakon odmrzavanja isperu se dva puta s 5 ml HBSS otopine (Lonza Group Ltd., Švicarska) te im se dodaje 2 ml 0,25 % otopine tripsina-EDTA kako bi se odvojile od podloge. Nakon 5 minuta inkubacije na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>, na stanice se doda 2 ml FBS-a koji zaustavlja djelovanje tripsina te se stanice resuspendiraju pipetom. Stanična suspenzija prenese se u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira 5 minuta na 500 g pri sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica resuspendira u 1 ml BEGM medija. Odredi se broj stanica u suspenziji te se nasađuju na prethodno obložene ploče u broju ovisnom o potrebama za određeni pokus.

### **3.3. Određivanje broja stanica**

Stanice resuspendirane u 1 ml medija za uzgoj stanica pomiješaju se s 0,4 % otopinom tripanskog plavila u omjeru koji ovisi o vrsti stanica te se nakon inkubacije tijekom 2 minute 10 µl otopine prenese u Neubauerovu komoricu i stanice se broje pod invertnim mikroskopom pri povećanju od 400 puta. Tripansko plavilo se koristi za razlikovanje mrtvih i živih stanica.

Žive stanice ga izlučuju pomoću membranskih pumpi, tako da žive stanice ostaju neobojene. Mrtve stanice ne mogu izbaciti tripanjsko plavilo pa se zato unutar njih akumulira te ih vidimo kao obojene, plave stanice. Neubauerova komorica se sastoji od 9 kvadrata volumena 0,0001 ml koji su podijeljeni na manje kvadrate. Stanice se broje u četiri rubna kvadrata te se broj stanica izračunava po sljedećoj formuli:

broj stanica po ml = srednja vrijednost broja stanica u 4 rubna kvadrata x razrjeđenje / 0,0001

### **3.4. Tretiranje stanica**

#### **3.4.1. Tretiranje stanica rekombinantnim humanim Hsp70 proteinom, LPS-om i s LTA**

Stanice su tretirane rekombinantnim humanim Hsp70 proteinom (rhHsp70) sintetiziranim u bakteriji *E. coli* s niskim sadržajem endotoksina (Enzo Life Sciences, SAD). Koncentracija endotoksina određena je testom lizata limulusovih amebocita (LAL) od strane proizvođača i iznosila je 2,7 EU/mg pročišćenog proteina te je ekvivalentna količina LPS-a korištena kao negativna kontrola u svim pokusima. Stanice su također tretirane LPS-om (pozitivna kontrola za aktivaciju TLR4) i s LTA (pozitivna kontrola za aktivaciju TLR2). LPS je izoliran iz *E. Coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, SAD), a LTA iz *S. aureus* (Invivogen, Francuska) i koncentracija endotoksina u njoj iznosila je 10 EU/mg.

U ovim uvjetima NCI-H292 i THP-1 stanice tretirane su u potpunom RPMI mediju, a THP-1 stanice su prethodno diferencirane u stanice slične makrofagima s 20 nM PMA tijekom 48 h. NHBE i PBEC stanice od zdravih ispitanika te PBEC KOPB stanice držane su u TIPSA mediju (BEGM medij (Lonza Group Ltd., Švicarska) s 10 µg/ml transferina i 5 µg/ml inzulina (Sigma-Aldrich, SAD) te 1 % otopine antibiotika-antimikotika) preko noći te su tretirane u istom tom mediju. Monociti su stavljeni u medij bez M-CSF-a preko noći te su tretirani u RPMI mediju bez FBS-a.

#### **3.4.2. Tretiranje stanica ekstraktom dima cigareta**

Ekstrakt dima cigareta (CSE, *engl.* cigarette smoke extract) pripreman je neposredno prije svakog pokusa. Dim dvije cigarete marke 3R4F Kentucky Research Cigarettes (University of Kentucky) kojima su odstranjeni filtri propuhan je kroz 25 ml odgovarajućeg medija bez seruma (RPMI za NCI-H292 i THP-1 stanice te monocite, EMEM (Lonza Group Ltd, Švicarska) za primarne bronhijalne epitelne stanice) upotrebom peristaltičke pumpe (Miniplus Evolution, Gilson, SAD). Svaka cigareta gorjela je oko 5 minuta. Tako pripremljeni ekstrakt dima cigareta označen je kao 100 % koncentrirani, a za pokuse je razrijeđen s odgovarajućim

medijem bez seruma (RPMI za NCI-H292, THP-1 i monocite, TIPSa za NHBE, PBEC i PBEC KOPB) na željene koncentracije unutar 60 minuta od pripreme (van der Toorn i sur., 2007).

Standardizacija ekstrakta dima cigareta izvršena je tako da je 100 % ekstrakt razrijeđen na koncentracije od 20 %, 15 %, 10 %, 5 % i 2,5 %. Zatim mu je, koristeći spektrofotometar (CECIL Aquarius CE 7200), izmjerena apsorbanca na 320 nm prema odgovarajućem mediju bez seruma kao slijepoj probi. Pokus je ponovljen šest puta u tri uzastopna dana. Tijekom pripreme ekstrakta dima cigareta za svaki pojedini pokus provjereno je odgovara li njegova apsorbanca na 320 nm uobičajenim standardiziranim vrijednostima. Zatim je taj ekstrakt korišten za tretiranje stanica sam ili u kombinaciji s rhHsp70.

### **3.4.3. Tretiranje stanica inhibitorima**

$1 \times 10^6$  NCI-H292 stanica po jažici nasadeno je na ploče s 12 jažica u kompletnom RPMI mediju. Nakon 24 h stanice su prvo tretirane inhibitorima tijekom 1 sata, a zatim im je dodan 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 te su stanice inkubirane sljedeća 24 h. THP-1 stanice također su nasadene na ploče s 12 jažica u broju od  $1 \times 10^6$  stanica po jažici, ali uz dodatak 20 nM PMA tijekom 48 h. Nakon diferencijacije, THP-1 stanice su prvo tretirane inhibitorima 1 h, a zatim im je dodan 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70. Nakon završene inkubacije medij iznad stanica se centrifugira na 1500 g tijekom 10 minuta na +4 °C, a dobiveni nadsloj razdijeli se na manje volumene i pospremi na -70 °C za određivanje koncentracije citokina.

Inhibitori koji su korišteni za pokuse su: 10  $\mu\text{g/ml}$  cikloheksimid (Cell Signaling Technology, SAD), inhibitor sinteze proteina (translacije); 10  $\mu\text{g/ml}$  aktinomicin D (Calbiochem, SAD), inhibitor sinteze mRNA (transkripcije); 10  $\mu\text{M}$  Bay11-7082 (Calbiochem, SAD), inhibitor NF- $\kappa\text{B}$ ; 10  $\mu\text{M}$  SP600125 (Santa Cruz Biotechnologies, SAD), inhibitor JNK; 10  $\mu\text{M}$  SB202190 (Cell Signaling Technology, SAD), inhibitor p38 MAPK; 50  $\mu\text{M}$  PD98059 (Cell Signaling Technology, SAD), inhibitor ERK i 100  $\mu\text{M}$  KNK437 (Calbiochem, SAD), inhibitor Hsp70.

Budući da su ovi inhibitori otopljeni u DMSO-u, kao kontrole su korištene stanice tretirane različitim koncentracijama DMSO-a: 0,01 % DMSO za SP600125 i Bay11-7082, 0,1 % DMSO za cikloheksimid, PD98059 i SB202190 te 1 % DMSO za aktinomicin D i KNK437. Koncentracije citokina u pokusu s inhibitorima izražene su kao udio (%) citokina izlučenih iz stanica tretiranih s rhHsp70, inhibitorima ili njihovom kombinacijom u odnosu na kontrolne stanice, a koncentracije citokina izlučenih iz kontrolnih stanica (stanice tretirane samo odgovarajućom koncentracijom DMSO-a) izražene su kao 100 %.

### 3.5. Određivanje koncentracije citokina

NCI-H292 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) nasadene su na ploče s 12 jažica i tretirane nakon inkubacije tijekom 24 h. THP-1 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) nasadene su na ploče s 12 jažica uz dodatak 20 nM PMA te su diferencirane tijekom 48 h, nakon čega je slijedilo tretiranje. NHBE i PBEC (30-50000 stanica po jažici) stanice nasadene su na ploče s 24 jažice prethodno obložene kolagenom i fibronektinom. Nakon postizanja više od 95 % konfluentnosti stanicama je promijenjen medij u TIPSA medij preko noći te su zatim tretirane također u TIPSA mediju. Monociti ( $0,5 \times 10^6$  stanica po jažici) nasadeni su na ploče s 24 jažice uz dodatak 25 ng/ml M-CSF-a te su diferencirani tijekom 7 dana. Nakon toga stavljeni su u medij bez M-CSF-a preko noći i zatim tretirani. Stanice su tretirane različitim koncentracijama rhHsp70, LPS-a, LTA, CSE-a ili njihovim kombinacijama tijekom 24 h. Nakon toga medij iznad stanica centrifugira se na 1500 g tijekom 10 minuta pri +4 °C, a dobiveni nadsloj razdjeli se na manje volumene i pospremi na -70 °C do analize.

Koncentracije IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  određivane su u mediju iznad stanica DuoSet ELISA test paketima (R&D Systems, SAD), a IL-6 samo u PBEC stanicama određivan je PeliKine Human IL-6 test paketom (Tecan, Švicarska).

Mikrotitarska ploča s 96 jažica najprije se obloži sa 100  $\mu$ l razrijeđenog vezujućeg protutijela preko noći na sobnoj temperaturi. Zatim se okretanjem ploče i njenim snažnim protresivanjem ukloni sva tekućina koja se nalazi u jažicama, a potom se jažice isperu s puferom za ispiranje (0,05 % Tween-20 u PBS-u). Potrebno je tri puta ispirati mikrotitarsku ploču, tako da se u svaku jažicu doda 400  $\mu$ l pufera. Zatim se u svaku jažicu doda 300  $\mu$ l otopine reagensa za blokiranje (1 % BSA u PBS-u) te se ploča inkubira na sobnoj temperaturi minimalno jedan sat. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča ispere se tri puta.

Uzorci i standardi razrijede se u otopini reagensa za razrjeđivanje (1 % BSA u PBS-u, osim kod određivanja IL-8: 0,1 % BSA u PBS-u s 0,05 % Tween-20) te se 100  $\mu$ l dodaje u svaku jažicu i inkubira dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča se ispere tri puta. Potom se u svaku jažicu dodaje 100  $\mu$ l detekcijskog protutijela koje se prije toga razrijedi u otopini reagensa za razrjeđivanje te se inkubira dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča se ispere tri puta. Zatim se u svaku jažicu dodaje 100  $\mu$ l radne otopine streptavidin-HRP (streptavidin-HRP razrijeđen 1:40 u reagensu za razrjeđivanje) i inkubira 20 minuta na sobnoj temperaturi u prostoru zaštićenom od svjetlosti. Nakon inkubacije, mikrotitarska ploča se ispere tri puta. Potom se u svaku jažicu doda 100  $\mu$ l otopine supstrata (1:1 mješavina tetrametilbenzidina i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), inkubira 5-10 minuta pri sobnoj temperaturi u prostoru zaštićenom od svjetlosti te se u svaku jažicu doda 50

μl otopine za zaustavljanje enzimske reakcije (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i lagano se protrese mikrotitarska ploča kako bi se svi sastojci otopine supstrata u jažici dobro pomiješali. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 450 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer).

### **3.6. Određivanje vijabilnosti stanica MTS testom**

MTS test služi za određivanje vijabilnosti stanica, odnosno za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojeni formazanski produkt.

Za ovaj test NCI-H292 (5000 stanica po jažici), NHBE (10000 stanica po jažici), THP-1 i monociti (50000 stanica po jažici) nasadjeni su na ploče s 96 jažica u 100 μl odgovarajućeg medija te se tretiranja vrše također u 100 μl medija tijekom 24 h.

Nakon tretiranja stanica, u svaku jažicu se dodaje 20 μl MTS reagensa (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, SAD) bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom 1-4 sata (THP-1 stanice 1 h, NHBE stanice 2 h, monociti 3 h, NCI-H292 stanice 4 h) na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Apsorbancija se mjeri na 490 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD) prema odgovarajućem mediju bez stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih (kontrolnih) stanica proglašena se 100 %, a vrijednosti apsorbancija tretiranih stanica izraze se kao udio (%) u odnosu na netretirane stanice. Rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

### **3.7. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica**

Određivanje katalitičke aktivnosti LDH služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari te se koristi kao pokazatelj integriteta stanične membrane. LDH je isključivo citoplazmatski enzim i ne bi smio biti prisutan u staničnom okolišu (mediju) ukoliko je integritet stanične membrane očuvan.

Princip ove metode temelji se na oksidaciji L-laktata u piruvat u prisustvu LDH pri čemu se NAD<sup>+</sup> reducira te se kontinuirano mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm pri 37 °C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi.



Za ovu analizu uzima se 20  $\mu$ l medija iznad stanica tretiranih za određivanje citokina (vidi poglavlje 3.5.) te se analiza vrši odmah nakon završene inkubacije od 2 minute na poluautomatskom analizatoru Trace 30 uz upotrebu reagensa za određivanje LDH (500  $\mu$ l). (Dijagnostika d.o.o., Hrvatska ili Greiner Diagnostic GmbH, Njemačka). Srednja vrijednost katalitičkih aktivnosti LDH netretiranih (kontrolnih) stanica proglašuje se 100 %, a vrijednosti katalitičkih aktivnosti LDH tretiranih stanica izraze se kao udio (%) u odnosu na netretirane stanice. Rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

### **3.8. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9**

Stanice su nasadene na bijele ploče s 96 jažica u broju ovisnom o vrsti stanica i kaspazi koja se određivala. NCI-H292 stanice: 10000 stanica po jažici za kaspaze-3/7 te 15000 stanica po jažici za kaspaze-8 i -9. THP-1 stanice i monociti: 20000 stanica po jažici za kaspazu-3/7 i 25000 stanica po jažici za kaspaze-8 i -9. NHBE stanice: 10000 stanica po jažici za sve određivane kaspaze. Stanice su tretirane s rhHsp70, LPS-om, LTA, CSE-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2, 4, 6 ili 8 h. Nakon toga izravno na medij dodaje se 100  $\mu$ l reagensa za određivanje kaspaza Caspase-Glo<sup>®</sup> luminescent assay test paketa (Promega, SAD), ploče se lagano promiješaju na 300-500 rpm 30 sekundi te se inkubiraju 3 h na sobnoj temperaturi u mraku. Luminescencija uzoraka mjeri se na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD).

Reagens za određivanje kaspaza-3/7 sadrži supstrat Z-DEVD-AMC, za kaspazu-8 Z-LETD-AMC, a za kaspazu-9 Z-LEHD-AMC u puferu optimiranom za aktivnost kaspaza, luciferaze i za lizu stanica. Nakon dodatka reagensa, stanice se liziraju, kaspaze oslobađaju, kidaju supstrat, te dolazi do luminescencije čiji je signal proporcionalan aktivnosti prisutne kaspaze.

### **3.9. Detekcija proteina Western blot metodom**

#### **3.9.1. Priprema staničnih lizata za Western blot analize**

NCI-H292 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) nasadene su na ploče s 12 jažica i tretirane nakon inkubacije tijekom 24 h. THP-1 stanice ( $1 \times 10^6$  stanica po jažici) su nasadene na ploče s 12 jažica uz dodatak 20 nM PMA te su diferencirane tijekom 48 h nakon čega je slijedilo tretiranje. NHBE (30-50000 stanica po jažici) stanice nasadene su na ploče s 24 jažice prethodno obložene kolagenom i fibronektinom. Nakon postizanja više od 95 % konfluentnosti stanicama je promijenjen medij u TIPSA medij preko noći te su zatim tretirane

također u TIPSA mediju. Monociti ( $0,5 \times 10^6$  stanica po jažici) nasađeni su na ploče s 24 jažice uz dodatak 25 ng/ml M-CSF-a te su diferencirani tijekom 7 dana. Nakon toga stavljeni su u medij bez M-CSF-a preko noći i zatim tretirani. Stanice su tretirane različitim koncentracijama rhHsp70, LPS-a, LTA, CSE-a ili njihovim kombinacijama tijekom 30 minuta, 2 h i 8 h. Nakon toga ploče se stave na led, medij iznad stanica ukloni se vakuum sisaljkom, a adherirane stanice isperu dva puta ledeno hladnim PBS-om. U svaku jažicu na ploči s 12 jažica doda se po 200  $\mu$ l, a na ploči s 24 jažice 100  $\mu$ l, ledeno hladnog pufera za liziranje stanica (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol, 1 mM natrij-ortovanadat uz dodatak proteaznih inhibitora (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)) i ostavi stajati na ledu 20 minuta. Zatim se stanice odvoje od podloge blagim struganjem silikonskim strugačem, a sadržaj svake jažice prenese se u epruveticu od 1,5 ml i centrifugira na 15000 g tijekom 20 minuta na +4 °C. Jedan dio dobivenog nadsloja pospremi se na -20 °C za određivanje koncentracije proteina, dok se u drugi dio nadsloja doda 6 puta koncentrirani Laemmlijev pufer za nanošenje uzoraka (0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 12 % SDS, 30 % glicerol, 0,2 % bromfenol plavilo, 12 %  $\beta$ -merkaptotanol u destiliranoj vodi). Uzorci se prokuhaju tijekom 3 minute na 97 °C, odmah potom ohlade na ledu i pospreme na -20 °C.

### **3.9.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu**

Koncentracija proteina u staničnim lizatima određena je pomoću bicinkonične kiseline (BCA). Ova metoda temelji se na stvaranju kompleksa proteina s  $\text{Cu}^{2+}$  pod alkalnim uvjetima nakon čega dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{+}$ . Količina redukcije proporcionalna je koncentraciji proteina. BCA stvara plavo-ljubičasti kompleks s  $\text{Cu}^{+}$  u alkalnom okolišu čija se apsorbancija mjeri na 570 nm.

Na ploču s 96 jažica dodaje se 25  $\mu$ l uzorka i standarda proteina razrijeđenih s fiziološkom otopinom te 100  $\mu$ l radnog reagensa (dobiva se miješanjem 50 volumena BCA i 1 volumena bakar (II) sulfata). Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C izmjeri se apsorbancija na 570 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD).

### **3.9.3. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu**

Proteini iz staničnih lizata, pripremljenih uz upotrebu pufera za liziranje stanica, razdvoje se okomitom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, *engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Za elektroforezu proteina korišten je 4 % sabijajući gel te 10 % razdvajajući gel. Sastav 4 % sabijajućeg gela je 6,1 ml ultračiste  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 ml pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8),

100 µl 10 % otopine SDS-a, 1,3 ml 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 µl 10 % otopine amonij-persulfata i 10 µl tetrametil-etilendiamina (TEMED). Za 10 % razdvajajući gel korišteno je 4,35 ml ultračiste H<sub>2</sub>O, 2,5 ml pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 µl 10 % otopine SDS-a, 3,0 ml 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 µl 10 % otopine amonij-persulfata i 5 µl TEMED-a.

Uzorci se nanese na gel u volumenu koji odgovara koncentraciji proteina od 20 ili 40 µg. Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,25 M glicin, 0,1 % otopina SDS-a) uz napon od 100 V tijekom 1,5 h. Kao standard za približno određivanje molekulske mase proteina korišten je standard proteina koji je na gelu davao osam obojenih proteinskih vrpca u rasponu od 6 do 200 kDa (Santa Cruz Biotechnology, SAD).

#### **3.9.4. Western blot analiza**

Proteini razdvojeni SDS-PAG elektroforezom prenesu se na nitroceluloznu membranu. Zatim se membrana zasiti puferom za blokiranje da bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na membranu u daljnjim koracima analize. Nakon toga membrana se inkubira primarnim protutijelom koje specifično prepoznaje ciljni protein. Na primarna protutijela vežu se sekundarna protutijela koja prepoznaju epitop na primarnom protutijelu, a na sebi imaju vezan enzim peroksidazu iz hrena. Taj enzim u prisustvu kemiluminiscentnog supstrata emitira svjetlo na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela na membrani te se izlaganjem svjetlu na uređaju za fotografiranje membrana ta mjesta vide kao zatamnjene vrpce.

Elektroforezom razdvojeni proteini prenijeti su na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm (GE Healthcare, SAD) u uređaju za elektro-prijenos proteina (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, SAD) pri jakosti struje od 250 mA tijekom 1,5 h. Da bi se provjerilo jesu li uzorci naneseni na gel sadržavali jednaku koncentraciju proteina te da li je postignuta ujednačenost prijenosa proteina na membranu, gelovi su bojani 0,1 % otopinom boje Coomassie briljant plavo R-250 u smjesi 40 % metanola i 10 % octene kiseline. Višak boje uklonjen je korištenjem otopine za odbojavanje (40 % metanola i 10 % octene kiseline u destiliranoj vodi). Ujednačenost prisustva proteina u različitim uzorcima očitana je vizualno. Osim toga, da bi se provjerilo je li postignuta ujednačenost prijenosa na membranu kao kontrola nam je poslužila i ravnomjerna ekspresija proteina aktina, MAPK te IκBα.

Nespecifično vezanje protutijela na slobodna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje (5 % obrano mlijeko u prahu u puferu za ispiranje (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi) tijekom 1 h na sobnoj

temperaturi, osim pri određivanju ekspresije aktina gdje se blokiranje vrši preko noći na +4 °C.

Membrana je zatim inkubirana razrijeđenim primarnim protutijelom preko noći na +4 °C, osim kod određivanja ekspresije aktina gdje je inkubacija primarnim antitijelom bila 2 h na sobnoj temperaturi:

- za detekciju ukupnog proteina ERK korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara C-terminalnom aminokiselinskom slijedu ERK1 štakora, a koja detektiraju ERK1 i ERK2 kinazu (ERK 1 (C-16), sc-93, Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % goveđeg serumskog albumina (BSA));
- za detekciju dvojno-fosforiliranog ERK-a korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnih oblika ERK1 (Thr202 i Tyr204) i ERK2 (Thr185 i Tyr187) kinaza (Phospho p44/42 MAPK (ERK1/2) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb, #8544, Cell SignalingTechnology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina JNK korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram cijelog aminokiselinskog slijeda (1-384) JNK1 čovjeka, koja detektiraju JNK1 i JNK2 (JNK (FL): sc-571; Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:500 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju dvojno-fosforiliranog JNK-a korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnih oblika JNK1 i JNK2 (Thr183 i Tyr185) kinaze (Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody, #9251, Cell SignalingTechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina p38 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara C-terminalnom aminokiselinskom slijedu p38 miša (p38 $\alpha$  (C-20): sc-535; Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju dvojno-fosforilirane p38 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudske p38 kinaze (Thr80 i Tyr182) (Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® RabbitmAb, #4511, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina I $\kappa$ B $\alpha$  korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram amino-terminalnog ostatka I $\kappa$ B $\alpha$  čovjeka (I $\kappa$ B $\alpha$  L35A5 mouse mAb,

#4814, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);

- za detekciju dvojno-fosforiliranog I $\kappa$ B $\alpha$  korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Ser32 i Ser36 područja aktivnih oblika I $\kappa$ B $\alpha$  (Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32/Ser36) (5A5) mouse mAb, #9246, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju Hsp70 proteina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram nativnog ljudskog Hsp70 proteina (HSP70/HSP72, mAb (C92F3A-5), #ADI-SPA-810, Enzo Life Sciences, Švicarska) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju TLR2 proteina korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram ostataka koji okružuju Val303 na ljudskom TLR2 proteinu (Toll-like Receptor 2 (D7G9Z) RabbitmAb, #12276, Cell Signaling Technologies, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju TLR4 proteina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram aminokiselina 198 - 395 na mišjem TLR4 proteinu (TLR4 antibody (25), sc-293072, Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju aktina korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram C-terminalnog ostatka ljudskog aktina (Actin (I19): sc-1616-R; Santa CruzBiotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA).

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta) te se inkubira sa sekundarnim protutijelom tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Korištena su sljedeća sekundarna protutijela:

- za detekciju mišjih protutijela (pri analizi aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$  i ekspresije Hsp70) korištena su IgG protutijela iz seruma konja imuniziranog imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, #7076, Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:3000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi aktivacije MAPK kinaza te ekspresije TLR2) korištena su IgG protutijela iz seruma koze imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (Anti-rabbit

IgG, HRP-linked antibody, #7074, Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:3000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);

- za detekciju mišjih protutijela (pri analizi ekspresije TLR4) korištena su protutijela iz seruma ovce imunizirane imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:10000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi ekspresije MAPK kinaza i aktina) korištena su protutijela iz seruma ovce imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:10000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu).

Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta) te se vizualizacija proteina postiže inkubacijom membrane tijekom 1 minute u mraku s reagensom za kemiluminiscenciju pripravljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich), 1 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 ml ultračiste H<sub>2</sub>O, 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 µl pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 10 ml DMSO-a). Membrana se zatim fotografira u Amersham AI600 Imager-u (GE Healthcare, SAD).

### **3.10. Detekcija mRNA metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*engl.* quantitative PCR, qPCR)**

#### **3.10.1. Izolacija RNA iz stanica**

Stanice su tretirane na isti način kao i za određivanje citokina i LDH te je nakon uklanjanja medija iznad stanica (koristi se za određivanje citokina i LDH) na stanice adherirane na ploču dodan TriReagent (Applied Biosystems, SAD) u volumenu ovisnom o površini jažica na ploči. Na ploču s 12 jažica dodaje se 400 µl, a na ploču s 24 jažice 250 µl TriReagenta po jažici. Nakon 5 minuta sadržaj jažice premješten je u epruveticu od 1,5 ml te je zamrznut na -20 °C do nastavka izolacije.

U sljedećem koraku izolacije RNA dodaje se 200 µl kloroforma na svakih 1 ml TriReagenta. Epruvetice se snažno protresu 15 sekundi te puste da stoje na sobnoj temperaturi 10 minuta i zatim centrifugiraju 15 minuta na 12000 g i +4 °C. Nakon toga vodena faza premjesti se u čistu epruveticu od 1,5 ml te se dodaje 0,5 ml izopropanola po 1 ml TriReagenta, epruvetice

se inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta i centrifugira 10 minuta na 12000 g i +4 °C. Nadsloj se zatim odlije, a na talog RNA dodaje se 1 ml 75 % etanola po 1 ml TriReagenta te se uzorak vorteksira. Zatim se ponovno centrifugira 5 minuta na 7500 g i na +4 °C. Etanol se odlije, a talog RNA prosuši na zraku oko 10 minuta. RNA se zatim otopi u vodi bez RNaze te joj se odredi koncentracija mjerenjem apsorbancije na 260 nm.

### 3.10.2. Sinteza cDNA

cDNA sintetizirana je iz RNA pomoću RevertAid First Strand cDNA Synthesis test paketa (Thermo Fisher Scientific, SAD).

RNA se razrijedi vodom bez RNaza tako da u reakcijskoj smjesi bude 1000 ng RNA. Za svaku reakciju dodaje se 1 µl početnica oligo dT, 1 µl početnica od nasumičnih heksanukleotida, 1 µl inhibitora RNaza, 4 µl reakcijskog pufera, 2 µl 10 mM smjese deoksinukleotid-trifosfata (dNTP) i 1 µl RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze te se zatim reakcijska smjesa dobro vorteksira.

Reakcijski uvjeti su inkubacija tijekom 5 minuta na 25 °C, zatim 60 minuta na 42 °C, a reakcija se prekida zagrijavanjem na 70 °C tijekom 5 minuta. Reakcija se provodi u uređaju za PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD).

### 3.10.3. Određivanje ekspresije gena

Nakon prevođenja RNA u cDNA ona se koristi kao uzorak u qPCR metodi uz primjenu sonde TaqMan. Taqman sonda je oligonukleotid koji je na svojem 5'-kraju obilježen fluorescentnom bojom, reporterom (FAM), a na 3'-kraju prigušivačem (*engl.* quencher). Količina PCR produkta mjeri se na principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, *engl.* fluorescence energy resonance transfer) i 5'-egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze. Taqman sonde i početnice vežu se za cDNA, a prije produljenja početnice zbog blizine fluorescentne boje i prigušivača nema fluorescencije. Kako se početnice produljuju, tako istovremeno DNA polimeraza razgrađuje Taqman sondu zbog svoje 5'-egzonukleazne aktivnosti, a fluorescentna boja tada može fluorescirati jer se prigušivač više ne nalazi u blizini. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini nastalog PCR produkta.

qPCR napravljen je na uređaju 7300 Real Time PCR System, uz korištenje TaqMan Universal MasterMix-a te TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, SAD):

- Hs02621280\_s1 za TLR2
- Hs00152939\_m1 za TLR4
- Hs00359163\_s1 za Hsp70

- Hs01555410\_m1 za IL-1 $\beta$
- Hs99999907\_m1 za  $\beta_2$ -mikroglobulin (B2M)
- Hs99999904\_m1 za peptidil-prolil-izomerazu A (PPIA)

Na ploču s 96 jažica za qPCR dodaje se 5  $\mu$ l MasterMix-a, 0,5  $\mu$ l početnice s TaqMan sondom, 0,5  $\mu$ l cDNA i 4  $\mu$ l vode po jažici. Ploče se zatim centrifugiraju 30 sekundi na 500 g, a reakcijski uvjeti su sljedeći: zagrijavanje na 50 °C tijekom 2 minute, zatim zagrijavanje na 95 °C tijekom 10 minuta te potom slijedi 40 ciklusa koji se sastoje od zagrijavanja na 95 °C 15 sekundi i na 60 °C 1 minutu u kojima se i vrši mjerenje fluorescencije.

Određivana je ekspresija gena za *tlr2*, *tlr4*, *hsp70* i *il-1 $\beta$* , a *b2m* i *ppia* služe kao referentni geni, odnosno geni čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem različitih čimbenika te se ekspresija ostalih određivanih gena izražava prema njihovoj ekspresiji.

Relativna ekspresija gena čiju ekspresiju želimo odrediti (CILJ) računa se u odnosu na referentni gen (REF), te u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak (NT) prema sljedećim formulama, gdje Ct označava ciklus umnažanja u kojem je postignut prag detekcije signala za pojedini uzorak.

$$\text{Relativna razina ekspresije} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{CILJ}} - Ct_{\text{REF}})_{\text{uzorak}} - (Ct_{\text{CILJ}} - Ct_{\text{REF}})_{\text{NT}}$$

### 3.11. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SEM). Statističke analize korištene za testiranje razlike između skupina podataka su t-test ili jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, *engl.* One-way analysis of variance). *Post-hoc* analize provedene su Sidakovom metodom.  $P < 0,05$  smatra se statistički značajnom vrijednošću. Podaci su analizirani upotrebom programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., SAD).

Kod procjene kombiniranog djelovanja rhHsp70 i LPS-a, LTA ili CSE-a izmjerene vrijednosti uspoređuju se s očekivanim (izračunatim) vrijednostima, a statističke razlike među njima testiraju se t-testom. Očekivane vrijednosti izračunate su na način da su zbrojene srednje vrijednosti nakon izlaganja jednoj tvari (rhHsp70) i drugoj tvari (LPS, LTA ili CSE) (Šegvić Klarić i sur., 2014; Weber i sur., 2005):

$$\text{srednja vrijednost (očekivana za rhHsp70 + LPS, LTA ili CSE)} = \text{srednja vrijednost (rhHsp70)} + \text{srednja vrijednost (LPS, LTA ili CSE)} - \text{srednja vrijednost (netretirane stanice)}$$



$SEM \text{ (očekivana za rhHsp70 + LPS, LTA ili CSE)} = [(SEM \text{ za rhHsp70})^2 + (SEM \text{ za LPS, LTA ili CSE})^2]^{1/2}$

Rezultati se interpretiraju na sljedeći način: ako su izmjerene vrijednosti značajno više u odnosu na očekivane vrijednosti smatra se da postoje interakcije sinergističkog tipa, a ako su izmjerene vrijednosti značajno niže u odnosu na očekivane vrijednosti smatra se da postoje interakcije antagonističkog tipa.

U slučaju da se vrijednosti nakon tretiranja pojedinim agensima smanjuju u odnosu na netretirane stanice, značajno više izmjerene vrijednosti u odnosu na očekivane ukazuju na interakcije antagonističkog tipa, a značajno niže vrijednosti u odnosu na očekivane na interakcije sinergističkog tipa.

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. ISPITIVANJE UPALNOG I CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA IZVANSTANIČNOG Hsp70 NA STANICAMA PLUĆNOG EPITELA**

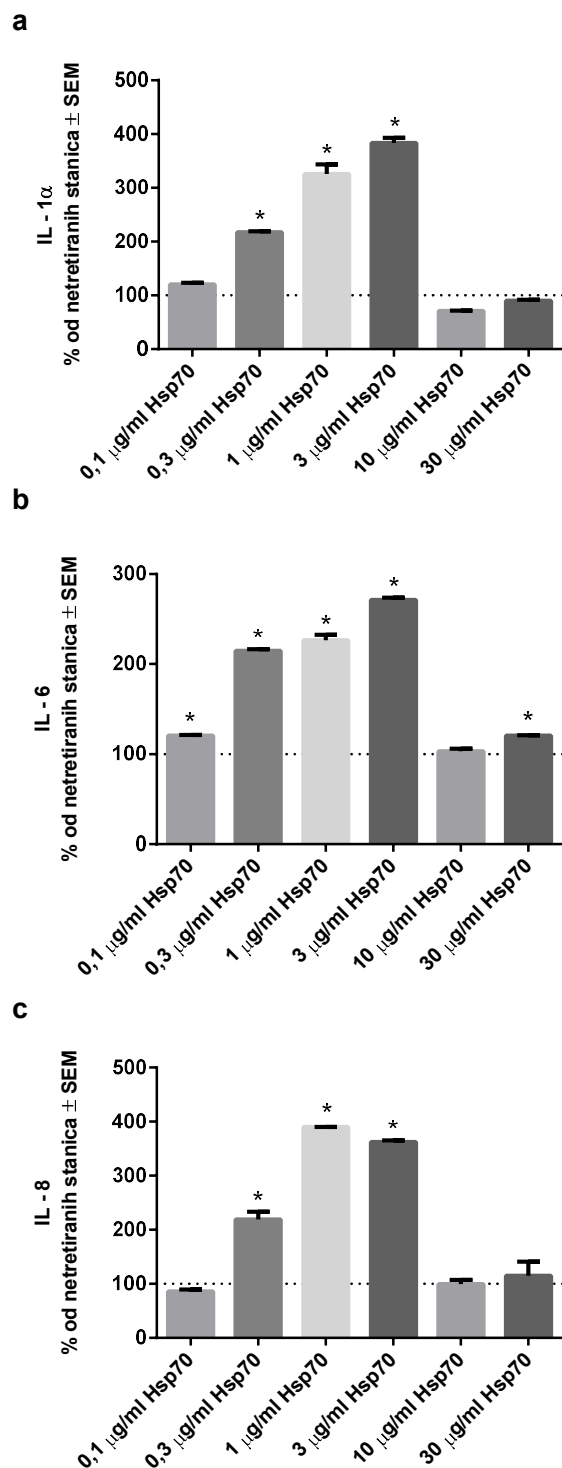
Ispitana su upalna i citotoksična djelovanja izvanstaničnog Hsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji (epitelne plućne stanice porijeklom od bolesnika s mukoepidermalnim karcinomom) te na različitim primarnim bronhijalnim epitelnim stanicama: NHBE (normalne humane bronhijalne epitelne stanice), PBEC (primarne traheobronhijalne stanice izolirane od zdravih donora) i PBEC KOPB (primarne traheobronhijalne stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om). Rekombinantni humani Hsp70 protein korišten je za tretiranje svih navedenih stanica.

##### **4.1.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na stanicama plućnog epitela**

###### ***4.1.1.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji***

Određene su koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  nakon tretiranja NCI-H292 stanica s 0,1, 0,3, 1, 3, 10 i 30  $\mu$ g/ml rhHsp70 tijekom 24 h. Vrijeme tretiranja od 24 sata korišteno je u ovom radu za sve tipove stanica za određivanje koncentracije citokina, a odabrano je prema rezultatima prethodnih istraživanja u kojima su se ispitivala vremena tretiranja od 4 h, 12 h, 24 h i 48 h (podaci nisu prikazani). Koncentracije citokina izlučenih iz netretiranih (kontrolnih) stanica izražene su kao 100 %, a koncentracije citokina izlučenih iz tretiranih stanica kao udio (%) u odnosu na netretirane stanice.

rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/ml inducirao je izlučivanje **IL-1 $\alpha$**  i **IL-8**, dok je izlučivanje **IL-6** inducirano svim koncentracijama rhHsp70 osim 10  $\mu$ g/ml (slika 4.1.1.). Izlučivanja **IL-1 $\beta$**  i **TNF- $\alpha$**  ne mogu se detektirati nakon primjene rhHsp70 tijekom 24 h korištenim ELISA test paketima.



**Slika 4.1.1.** Grafički prikaz citokina IL-1 $\alpha$  (a), IL-6 (b) i IL-8 (c) izlučenih iz NCI-H292 stanica nakon tretiranja s rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### ***4.1.1.2. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na primarnim stanicama plućnog epitela***

Za NHBE i PBEC stanice korišten je raspon koncentracija rhHsp70 kao i za NCI-H292 staničnu liniju (0,1, 0,3, 1, 3, 10 i 30 µg/ml), dok su PBEC KOPB stanice tretirane s 0,1, 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 zbog ograničenog broja stanica dostupnih za ispitivanja. Navedene primarne stanice izolirane su od različitih donora (n=3-5) te su stoga zbog mogućih značajnih interindividualnih razlika koncentracije citokina izlučene iz njih u medij izražene u apsolutnim vrijednostima tj. u pg/ml (a ne u relativnim kao kod NCI-H292 stanične linije, tj. kao udio u odnosu na netretirane stanice).

##### **NHBE stanice (n=5):**

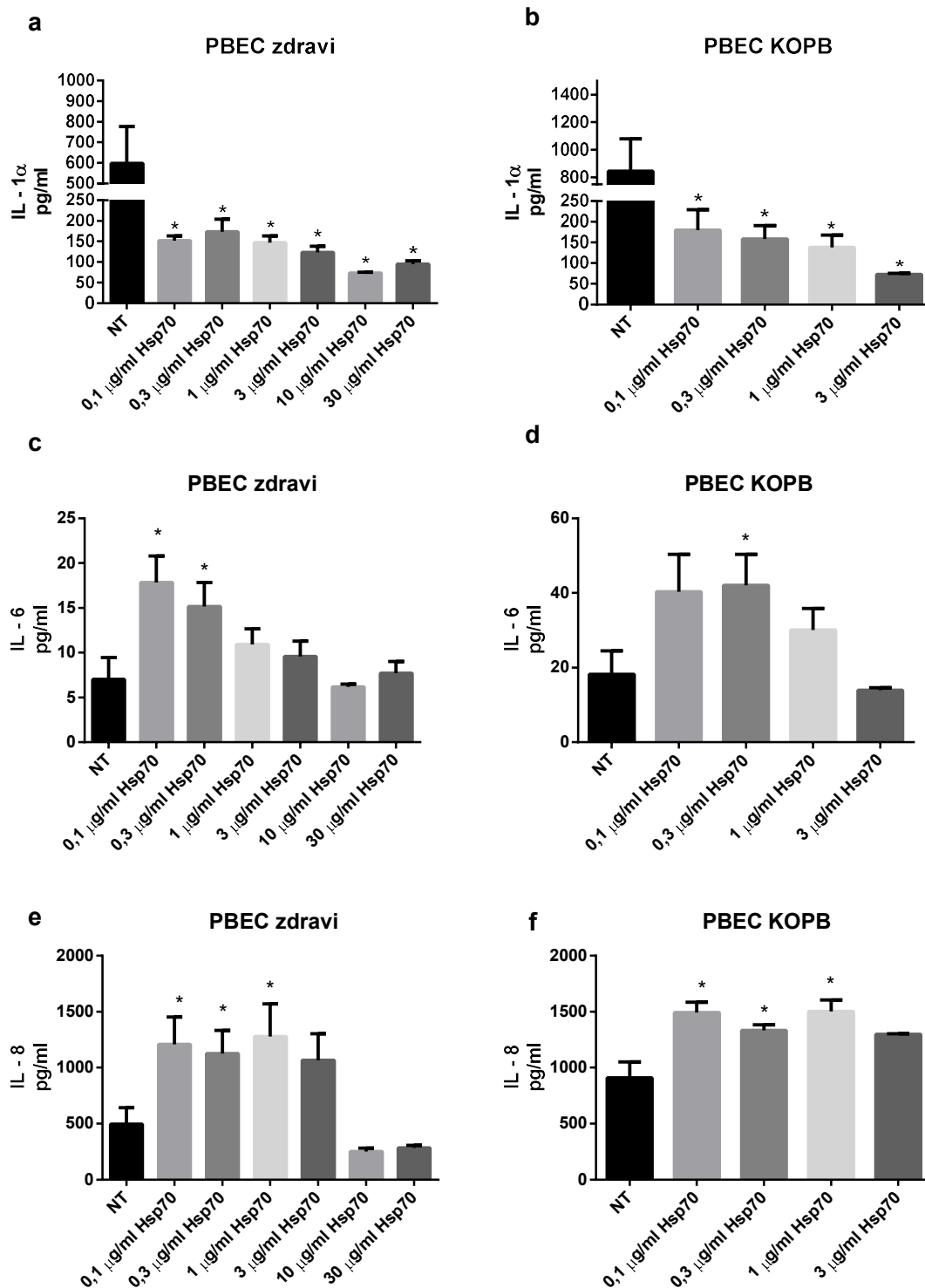
Koncentracije **IL-1 $\alpha$** , **IL-6** i **IL-8** nisu bile značajno različite nakon tretiranja bilo kojom od ispitivanih koncentracija rhHsp70 u odnosu na netretirane stanice (podaci nisu prikazani). **IL-1 $\beta$**  i **TNF- $\alpha$**  nisu detektirani korištenim ELISA test paketima te stoga nisu niti određivani u PBEC i PBEC KOPB stanicama.

##### **PBEC stanice (n=4):**

Koncentracija **IL-1 $\alpha$**  bila je značajno snižena u odnosu na netretirane stanice za sve ispitivane koncentracije rhHsp70. Koncentracija **IL-6** bila je statistički značajno povišena u stanicama tretiranim s 0,1 i 0,3 µg/ml rhHsp70, a **IL-8** s 0,1, 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 (slika 4.1.2. a, c, e).

##### **PBEC KOPB stanice (n=3):**

Koncentracija **IL-1 $\alpha$**  bila je značajno snižena u odnosu na netretirane stanice za sve ispitivane koncentracije rhHsp70. Koncentracija **IL-6** bila je značajno povišena u stanicama tretiranim s 0,3 µg/ml rhHsp70, a **IL-8** u stanicama tretiranim s 0,1, 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 (slika 4.1.2. b, d, f).



**Slika 4.1.2.** Grafički prikaz citokina IL-1α, IL-6 i IL-8 izlučenih iz PBEC (a, c, e; n=4) te PBEC KOPB (b, d, f; n=3) stanica nakon tretiranja s rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

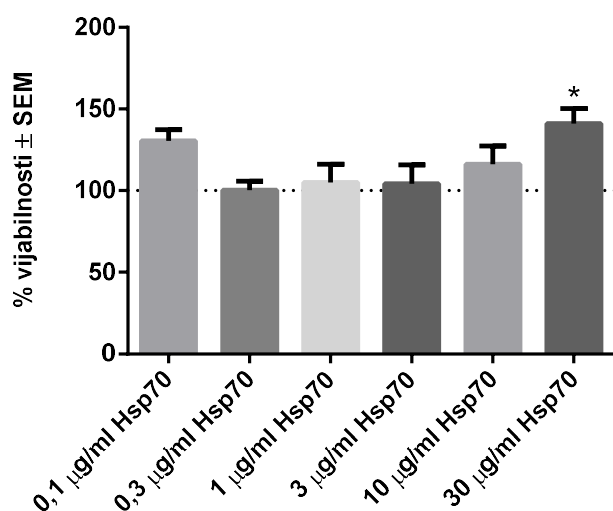
#### 4.1.2. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja rhHsp70 na stanicama plućnog epitela

Citotoksičnost djelovanja rhHsp70 na NCI-H292 i NHBE stanicama ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTS testom (ukazuje na metaboličku aktivnost, tj. na redukcijsku sposobnost stanica), određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica (ukazuje na očuvanost integriteta stanične membrane) te određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama (ukazuje na način umiranja stanica – apoptozu).

##### 4.1.2.1. Utjecaj rhHsp70 na vijabilnost stanica plućnog epitela (MTS test)

NCI-H292 i NHBE stanice su tretirane različitim koncentracijama rhHsp70 (0,1-30  $\mu\text{g/ml}$ ) tijekom 24 h. Rezultati su izraženi kao udio (%) vijabilnosti tretiranih stanica u odnosu na netretirane stanice, čija je vijabilnost izražena kao 100 %.

rhHsp70 nije utjecao na vijabilnost **NCI-H292** stanica (podaci nisu prikazani), dok 30  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 povećava vijabilnost **NHBE** stanica (slika 4.1.3.).



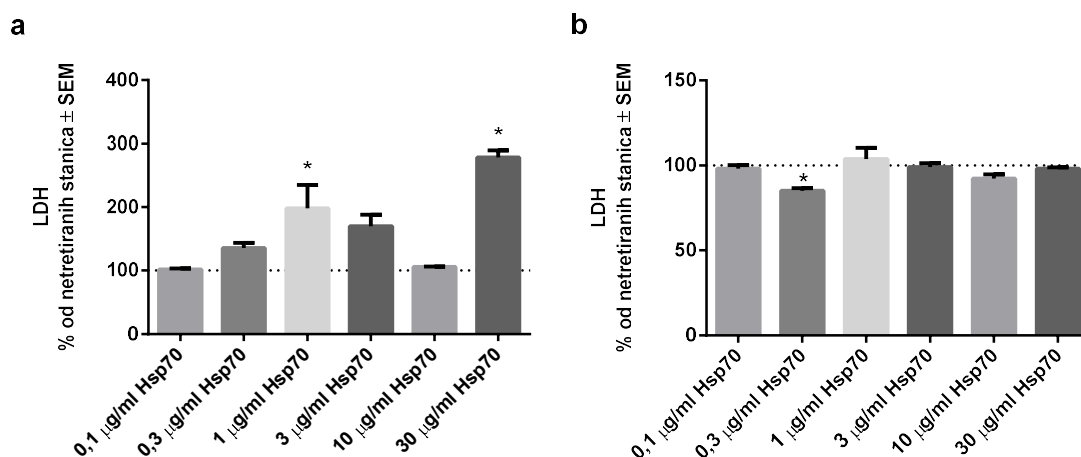
**Slika 4.1.3.** Grafički prikaz vijabilnosti NHBE stanica tretiranih s rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=5).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### 4.1.2.2. Utjecaj rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica plućnog epitela

NCI-H292 i NHBE stanice tretirane su s 0,1-30 µg/ml rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su izraženi kao udio (%) aktivnosti LDH izlučene u medij iznad tretiranih stanica u odnosu na LDH aktivnost u mediju iznad netretiranih stanica, koja je izražena kao 100 %.

U **NCI-H292** stanicama koncentracije od 1 i 30 µg/ml rhHsp70 dovode do značajnog otpuštanja LDH iz stanica u odnosu na netretirane stanice, dok 0,3 µg/ml rhHsp70 potiskuje otpuštanje LDH iz **NHBE** stanica (slika 4.1.4).



**Slika 4.1.4.** Grafički prikaz katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad NCI-H292 (a) i NHBE (b) stanica tretiranih s rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### 4.1.2.3. Utjecaj rhHsp70 na način umiranja stanica plućnog epitela

##### NCI-H292 stanice:

Stanice su tretirane s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 tijekom 2, 4, 6 i 8 h. Navedene koncentracije odabrane su kao najznačajnije iz citokinskih pokusa. Rezultati su izraženi kao udio (%) aktivnosti kaspaze u tretiranim stanicama u odnosu na aktivnost kaspaze u netretiranim stanicama, koja je izražena kao 100 %. Dobiveni rezultati (n=3) su prikazani u tablici 4.1.1. Aktivnost **kaspaza-3/7** bila je značajno snižena u odnosu na netretirane stanice nakon 2 h za sve tri koncentracije rhHsp70 i nakon 8 h uz 1 i 3 µg/ml rhHsp70. Nakon 8 h došlo je do snažne aktivacije **kaspaze-8** nakon primjene 1 i 3 µg/ml rhHsp70. **Kaspaza-9** bila je značajno aktivirana nakon 2 h tretiranja s 1 i 3 µg/ml rhHsp70.



**NHBE stanice:**

Prema dobivenim rezultatima za NCI-H292 stanice odabrane su koncentracije i vremena tretiranja za NHBE stanice. Ove stanice su tretirane s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 2 i 8 h, no pod navedenim uvjetima nije došlo do značajne aktivacije ili inhibicije niti jedne od ispitivanih kaspaza (podaci nisu prikazani).

**Tablica 4.1.1.** Aktivnost kaspaza u NCI-H292 stanicama tretiranim s rhHsp70.

		<b>0,3 µg/ml Hsp70</b>	<b>1 µg/ml Hsp70</b>	<b>3 µg/ml Hsp70</b>
<b>KASPAZE-3/7</b>	<b>2 h</b>	<b>75,77 ± 0,70*</b>	<b>77,79 ± 2,25*</b>	<b>79,91 ± 1,35*</b>
	<b>4 h</b>	86,76 ± 7,56	86,02 ± 3,16	90,28 ± 5,68
	<b>6 h</b>	106,00 ± 11,74	106,00 ± 3,89	120,50 ± 2,82
	<b>8 h</b>	93,45 ± 3,72	<b>34,01 ± 10,89*</b>	<b>31,28 ± 11,06*</b>
<b>KASPAZA-8</b>	<b>2 h</b>	90,29 ± 2,63	93,23 ± 2,07	88,53 ± 2,26
	<b>4 h</b>	107,70 ± 0,04	96,43 ± 0,04	115,30 ± 0,04
	<b>6 h</b>	105,80 ± 4,12	99,22 ± 1,78	107,20 ± 1,64
	<b>8 h</b>	106,60 ± 7,21	<b>155,50 ± 5,01*</b>	<b>161,10 ± 30,06*</b>
<b>KASPAZA-9</b>	<b>2 h</b>	97,53 ± 1,09	<b>139,50 ± 0,76*</b>	<b>152,30 ± 3,74*</b>
	<b>4 h</b>	100,90 ± 2,41	95,83 ± 3,42	98,03 ± 1,09
	<b>6 h</b>	99,04 ± 0,03	92,69 ± 4,57	98,60 ± 3,28
	<b>8 h</b>	95,20 ± 3,78	97,15 ± 7,55	88,98 ± 5,78

Rezultati su prikazani kao % od aktivnosti kaspaze u netretiranim stanicama.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

### 4.1.3. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela

#### 4.1.3.1. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji

LPS i LTA komponente su Gram-negativnih, odnosno Gram-pozitivnih bakterija te su poznati agonisti TLR4 i TLR2 receptora. Na temelju prethodnih istraživanja u kojima su ispitana djelovanja različitih koncentracija LPS-a i LTA (0,1, 0,5, 1 i 5 µg/ml) na sve stanice korištene u ovom doktorskom radu, odabrana je po jedna koncentracija ovih agenasa za tretiranje stanica u daljnjim ispitivanjima i to 0,1 µg/ml za LPS te 1 µg/ml za LTA. Stanice su istodobno tretirane kombinacijama LPS-a i LTA s rhHsp70 kako bi se ispitala mogućnost modulacije upalnog djelovanja rhHsp70, a čime bi se na oponašala moguća *in vivo* situacija koja se razvija pri egzacerbacijama u bolesnika s KOPB-om.

NCI-H292 stanice tretirane su LPS-om, LTA ili njihovom kombinacijom s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 tijekom 24 h (koncentracije rhHsp70 za kombinirana tretiranja odabrane su na temelju rezultata individualnih tretiranja s rhHsp70). Citokini IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 izmjereni su u mediju iznad stanica. Interakcije između rhHsp70 i LPS-a ili LTA dobivene su matematičko-statističkim modelom koji se primjenjuje za kombinirane eksperimente. Ovaj model predviđa kombinirana djelovanja na način da uspoređuje izmjerena i očekivana djelovanja kombiniranih tretiranja.

#### **IL-1 $\alpha$ :**

**LPS u kombinaciji** s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 potaknuo je značajno lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, no nije bilo razlike između IL-1 $\alpha$  izlučenog nakon tretiranja stanica samim LPS-om ili kombinacijama (slika 4.1.5.). **LTA i njegove kombinacije** s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 potaknule su značajno lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, a koncentracija IL-1 $\alpha$  izlučenog nakon tretiranja stanica kombinacijom 0,3 µg/ml rhHsp70 i LTA značajno je snižena u odnosu na vrijednost nakon tretiranja samo s LTA. Interakcije između LTA i rhHsp70 antagonističkog su tipa za sve tri ispitivane koncentracije rhHsp70 (slika 4.1.6.).

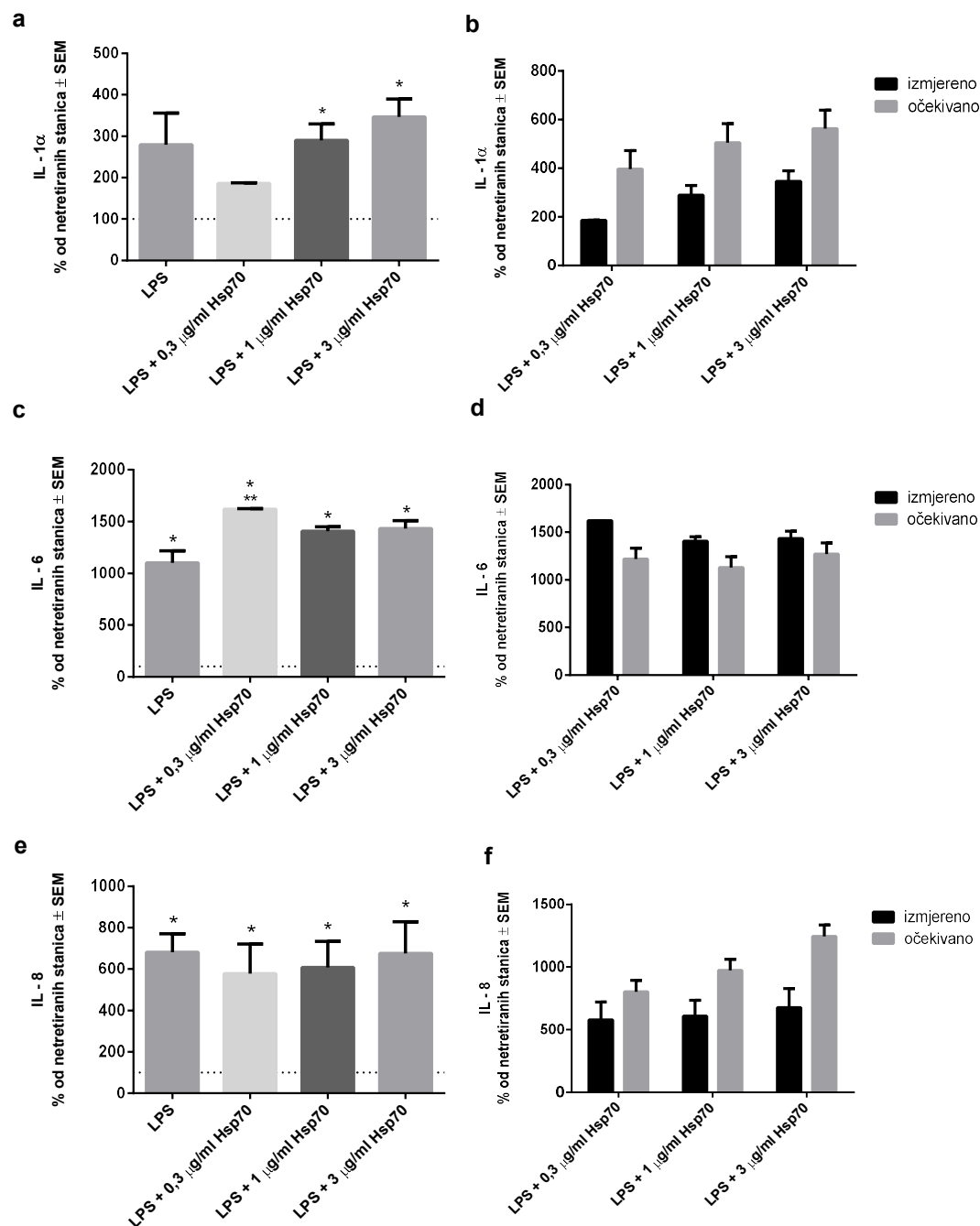
#### **IL-6:**

**LPS i njegove kombinacije** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 uzrokovali su značajno više lučenje IL-6 u NCI-H292 stanicama u odnosu na netretirane stanice, dok je koncentracija izlučenog IL-6 nakon tretiranja LPS-om i 0,3 µg/ml rhHsp70 značajno viša i u odnosu na sam LPS, no interakcije ipak ne pokazuju sinergizam (slika 4.1.5.). **LTA i njegova kombinacija** s 3 µg/ml rhHsp70 uzrokovala je značajno lučenje IL-6 u odnosu na netretirane stanice, dok između IL-

6 izlučenog nakon tretiranja samo s LTA i kombinacijama LTA i rhHsp70 nema razlike. Ipak, izračunate interakcije između LTA i rhHsp70 antagonističkog su tipa (slika 4.1.6.).

#### **IL-8:**

**LPS i njegove kombinacije** s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokovale su značajno više lučenje IL-8 u NCI-H292 stanicama u odnosu na netretirane stanice, no IL-8 izlučen nakon kombiniranih tretiranja nije se razlikovao od IL-8 izlučenog nakon tretiranja samim LPS-om, niti su izračunate interakcije bile značajne (slika 4.1.5.). **LTA i njegove kombinacije** s 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokovale su značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice, dok jedino između IL-8 izlučenog nakon tretiranja samo s LTA i u kombinaciji LTA i 0,3 rhHsp70 ima značajne razlike. Izračunate interakcije između LTA i rhHsp70 antagonističkog su tipa (slika 4.1.6.).



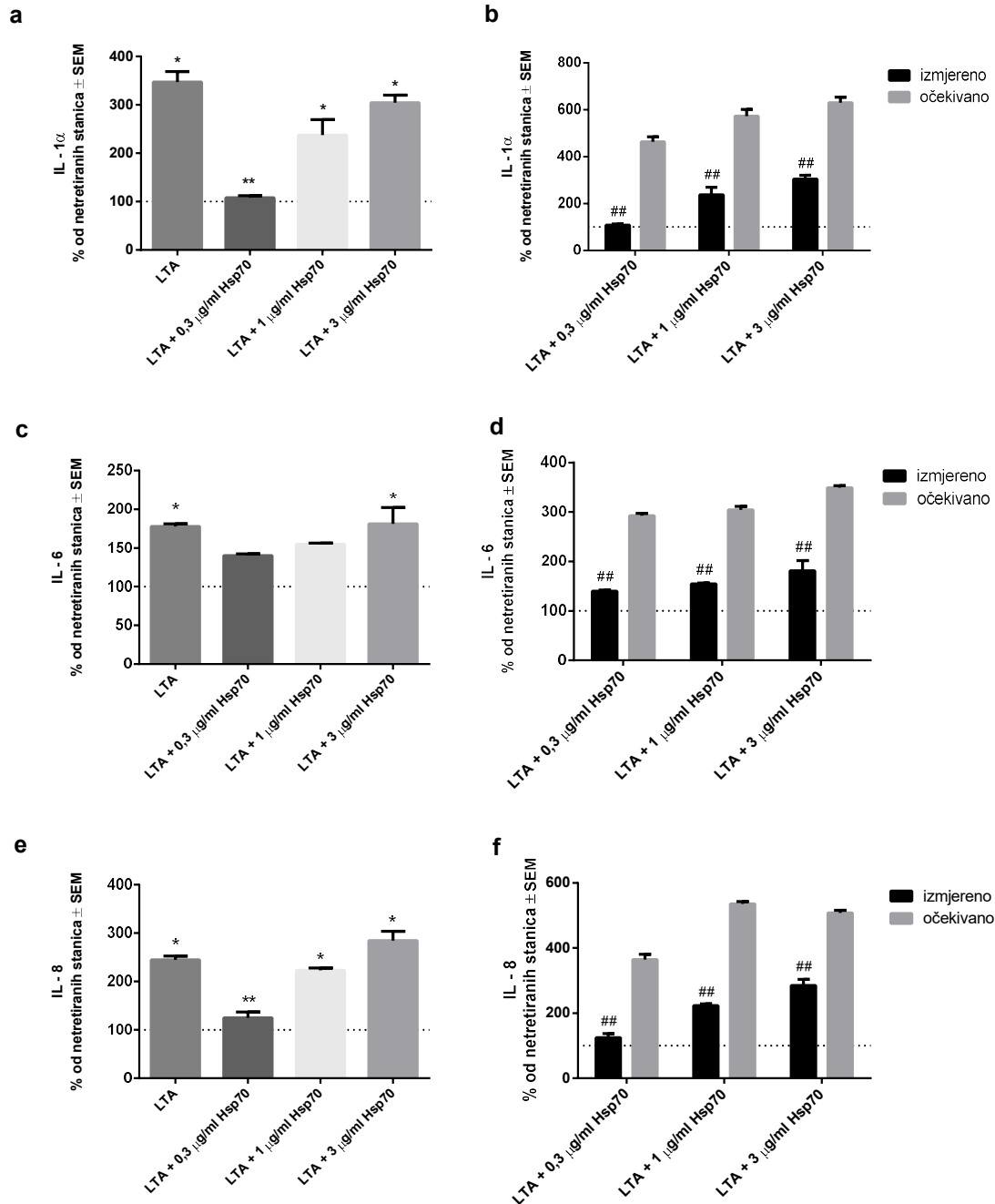
**Slika 4.1.5.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije LPS-a s rhHsp70 na lučenje IL-1α (a, b), IL-6 (c, d) i IL-8 (e, f) iz NCI-H292 stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, c, e) Lučenje IL-1α (a), IL-6 (c) i IL-8 (e) nakon tretiranja tijekom 24 h samim LPS-om i kombinacijom LPS-a i rhHsp70.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LPS

(b, d, f) Utjecaj interakcija LPS-a i rhHsp70 na lučenje IL-1α (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.



**Slika 4.1.6.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije LTA s rhHsp70 na lučenje IL-1 $\alpha$  (a, b), IL-6 (c, d) i IL-8 (e, f) iz NCI-H292 stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

(a, c, e) Lučenje IL-1 $\alpha$  (a), IL-6 (c) i IL-8 (e) nakon tretiranja tijekom 24 h samom LTA i kombinacijom LTA i rhHsp70.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LTA

(b, d, f) Utjecaj interakcija LTA i rhHsp70 na lučenje IL-1 $\alpha$  (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

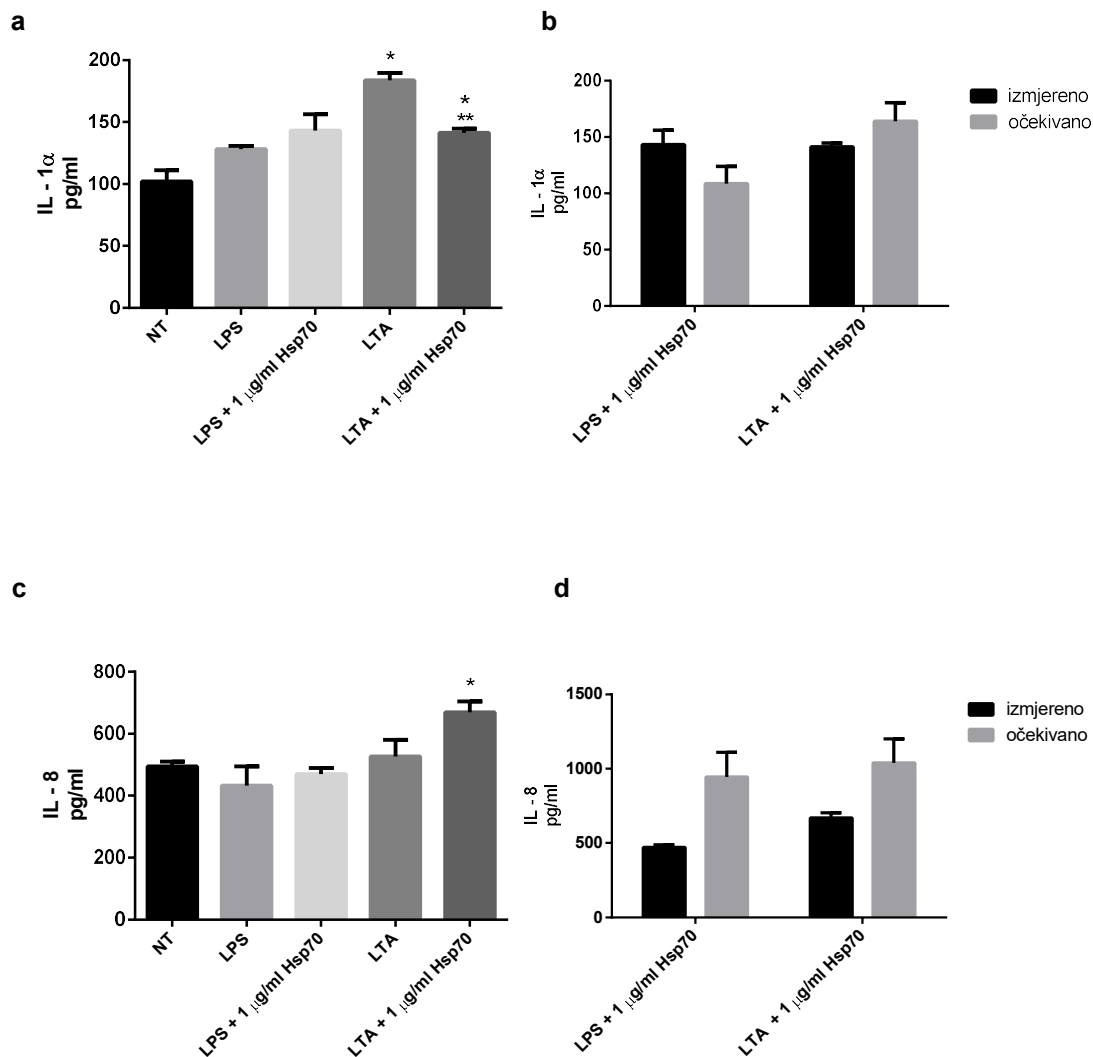
## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

#### ***4.1.3.2. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim stanicama plućnog epitela***

Primarne stanice plućnog epitela tretirane su s 0,1 µg/ml LPS-a, 1 µg/ml LTA i njihovim kombinacijama s 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 24 h. Za kombinirana tretiranja primarnih stanica odabrana je samo jedna koncentracija rhHsp70 (1 µg/ml) zbog ograničenog proliferacijskog kapaciteta, a time i dostupnosti, primarnih stanica. Citokini IL-1α, IL-6 i IL-8 izmjereni su u mediju iznad stanica.

##### **NHBE stanice:**

Sam LPS ne uzrokuje značajno lučenje određenih citokina u NHBE stanicama. Tretiranja kombinacijama LPS-a s rhHsp70 ne uzrokuje značajno lučenje **IL-1α** u NHBE stanicama u odnosu na netretirane stanice, dok LTA sam i u kombinaciji s rhHsp70 uzrokuje značajno lučenje IL-1α u odnosu na netretirane stanice. IL-1α izlučen nakon tretiranja kombinacijom LTA i rhHsp70 značajno je niži od onog izlučenog nakon tretiranja samo s LTA, no izračunate interakcije nisu značajne. LTA potiče značajno lučenje **IL-6** i **IL-8** u odnosu na netretirane stanice, dok i njegove kombinacije s rhHsp70 potiču lučenje **IL-8** u odnosu na netretirane stanice, no IL-8 izlučen nakon ovog dvojnog tretiranja ne razlikuje se od koncentracije izlučene nakon tretiranja samim LTA te nema značajnih interakcija (slika 4.1.7.).



**Slika 4.1.7.** Grafički prikaz utjecaja kombinacija LPS-a i LTA s rhHsp70 na lučenje IL-1α (a, b) i IL-8 (c, d) iz NHBE stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, c) Lučenje IL-1α (a) i IL-8 (c) nakon tretiranja tijekom 24 h samim LPS-om ili LTA i kombinacijom LPS-a ili LTA s rhHsp70.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LTA

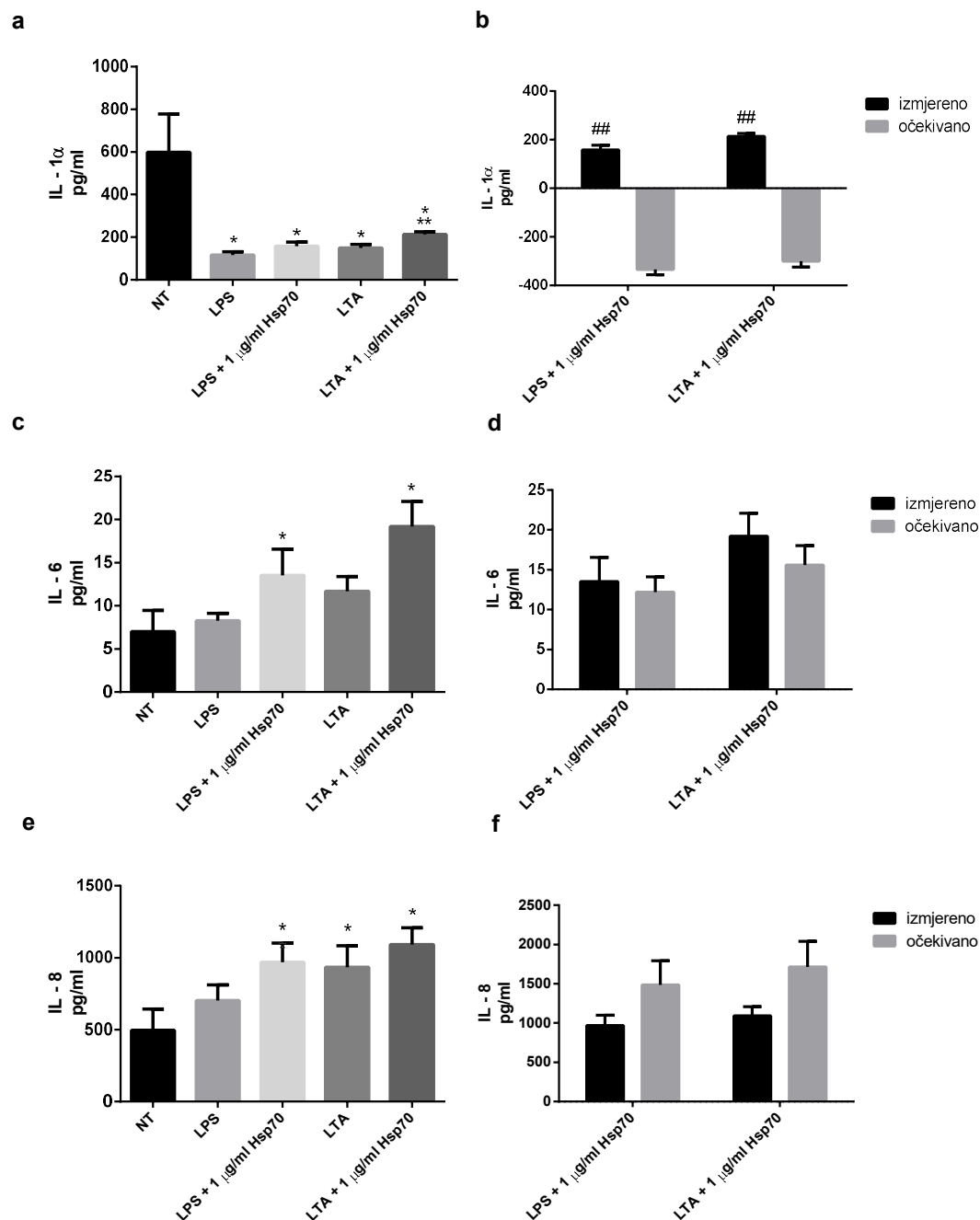
(b, d) Utjecaj interakcija LPS-a i LTA s rhHsp70 na lučenje IL-1α (b) i IL-8 (d). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

**PBEC stanice:**

**IL-1 $\alpha$ :** Tretiranje PBEC stanica LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70 uzrokuje smanjeno lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. Koncentracija IL-1 $\alpha$  izlučenog nakon kombiniranog tretiranja LTA s rhHsp70 značajno je viša u odnosu na IL-1 $\alpha$  izlučenog nakon tretiranja samo s LTA te je izračunati tip interakcije antagonističan. Uz to, iako za LPS i njegovu kombinaciju s rhHsp70 nema razlike u lučenju citokina u odnosu na sami LPS, izračunati tip interakcije ipak je antagonističan.

**IL-6 i IL-8:** LTA uzrokuje značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice, dok kombinirano tretiranje LPS-om ili LTA s 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 uzrokuje značajno lučenje IL-6 i IL-8 u odnosu na netretirane stanice. Nije opažena razlika između kombiniranih tretiranja i onih sa samim LPS-om ili LTA, kao ni značajne interakcije (slika 4.1.8.).





**Slika 4.1.8.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije LPS-a ili LTA s rhHsp70 na lučenje citokina iz PBEC stanica izoliranih iz zdravih ispitanika nakon tretiranja tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=3$ ).

(a, c, e) Lučenje IL-1 $\alpha$  (a), IL-6 (b) i IL-8 (c) nakon tretiranja tijekom 24 h samim LPS-om ili LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70. NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na LTA

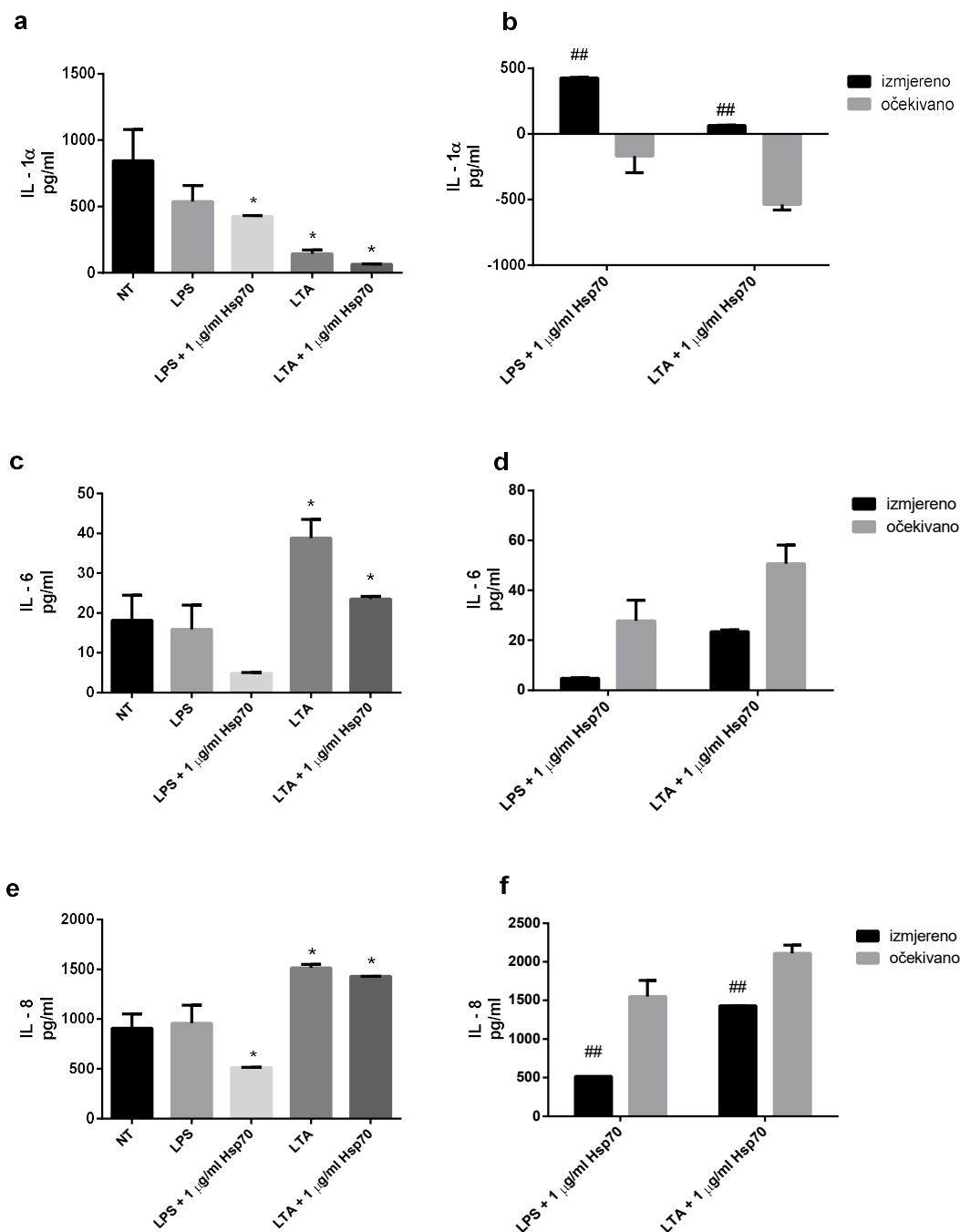
(b, d, f) Utjecaj interakcija LPS-a ili LTA i rhHsp70 na lučenje IL-1 $\alpha$  (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P<0,05$ ) antagonistički učinak

**PBEC KOPB stanice:**

**IL-1 $\alpha$ :** LTA te kombinirana tretiranja LPS-om ili LTA s rhHsp70 potiskuju izlučivanje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, no te se koncentracije ne razlikuju od onih izlučenih nakon tretiranja samim LPS-om ili LTA. Ipak, izračunate interakcije su antagonističkog tipa (slika 4.1.9. a, b).

**IL-6 i IL-8:** LPS nema značajan utjecaj na lučenje citokina iz ovih stanica, a lučenje IL-8 nakon tretiranja kombinacijom LPS-a i rhHsp70 značajno je niže u odnosu na lučenje IL-8 iz netretiranih stanica. LTA i njegova kombinacija s rhHsp70 značajno više potiču lučenje IL-6 i IL-8 od netretiranih stanica, no ne razlikuje se od lučenja iz stanica tretiranih samim LTA. Izračunate interakcije za kombinacije LPS-a i LTA s rhHsp70 na lučenje IL-8 antagonističkog su tipa (slika 4.1.9. c-f).



**Slika 4.1.9.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije LPS-a ili LTA s rhHsp70 na lučenje citokina iz PBEC stanica izoliranih iz bolesnika s KOPB-om nakon tretiranja tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, c, e) Lučenje IL-1α (a), IL-6 (c) i IL-8 (e) nakon tretiranja tijekom 24 h samim LPS-om ili LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70. NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

(b, d, f) Utjecaj interakcija LPS-a ili LTA i rhHsp70 na lučenje IL-1α (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

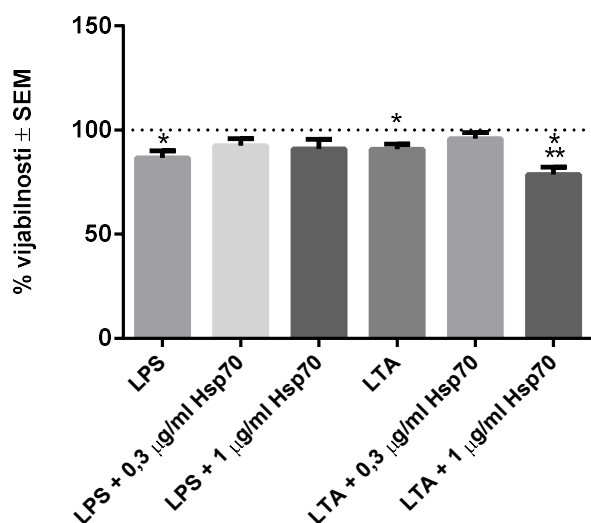
#### 4.1.4. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela

Citotoksičnost djelovanja LPS-a, LTA te njihovih kombinacija s rhHsp70 na NCI-H292 i NHBE stanicama ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTS testom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica te određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama.

##### 4.1.4.1. Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica plućnog epitela (MTS test)

Stanice su tretirane tijekom 24 h s 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS-a, 1  $\mu\text{g/ml}$  LTA te njihovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 (NCI-H292 stanice), odnosno s 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 (NHBE stanice).

LPS, LTA i njihove kombinacije s rhHsp70 nisu utjecali na vijabilnost **NCI-H292** stanica, no ipak su interakcije između LTA i 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 bile antagonističkog tipa (podaci nisu prikazani). LPS, LTA te kombinacija LTA i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 značajno su smanjili vijabilnost **NHBE** stanica, no njihove interakcije nisu bile značajne (slika 4.1.10.).



**Slika 4.1.10.** Grafički prikaz vijabilnosti NHBE stanica tretiranih LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

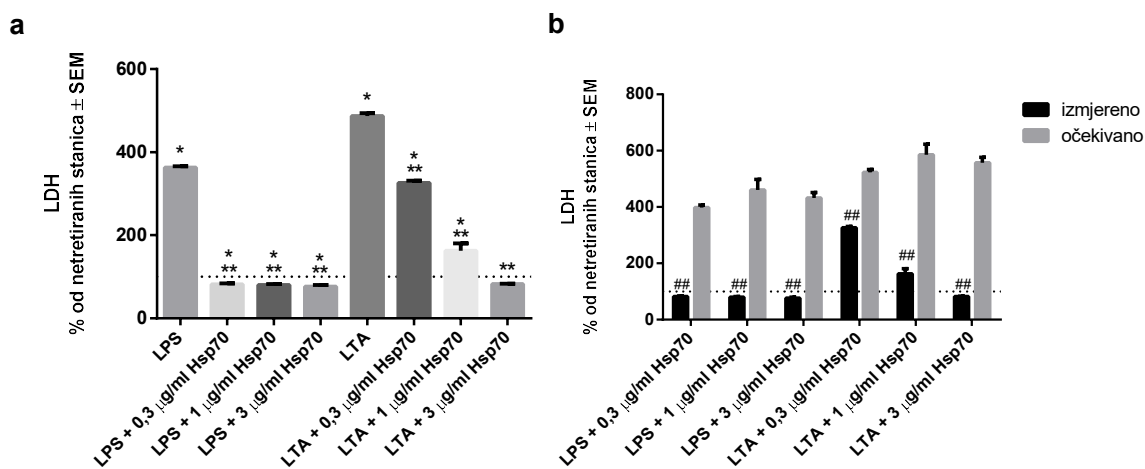
\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LTA

#### 4.1.4.2. Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica plućnog epitela

NCI-H292 i NHBE stanice tretirane su s 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS-a, 1  $\mu\text{g/ml}$  LTA te njihovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 (NCI-H292 stanice), odnosno s 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 (NHBE stanice) tijekom 24 h.

##### NCI-H292 stanice:

Tretiranje ovih stanica samo **LPS-om** dovodi do značajnog otpuštanja LDH u medij iznad stanica u odnosu na netretirane stanice, no kombinacije LPS-a i rhHsp70 u svim ispitivanim koncentracijama značajno smanjuju lučenje LDH u odnosu na netretirane NCI-H292 stanice i stanice tretirane samo LPS-om te su njihove izračunate interakcije antagonističkog tipa. **LTA** i njegove kombinacije s 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 potiču značajno izlučivanje LDH u odnosu na netretirane stanice, a aktivnost LDH u mediju nakon tretiranja kombinacijama LTA i rhHsp70 bila je manja od aktivnosti LDH izlučene nakon tretiranja samo s LTA za sve ispitivane kombinacije te su izračunate interakcije bile antagonističkog tipa (slika 4.1.11.).



**Slika 4.1.11.** Grafički prikaz utjecaja LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad NCI-H292 stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=6).

(a) Katalitička aktivnost LDH u mediju iznad NCI-H292 stanica tretiranih LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LPS ili LTA

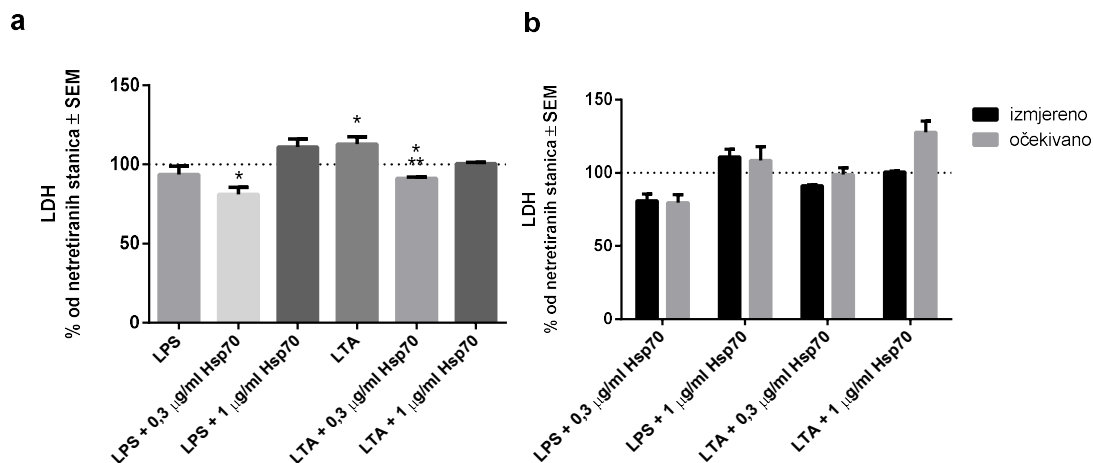
(b) Utjecaj interakcija LPS-a ili LTA i rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

### NHBE stanice:

Tretiranje samo s LTA dovodi do značajnog otpuštanja LDH u medij iznad stanica u odnosu na netretirane stanice.

**Kombinacije LPS-a ili LTA s 1 µg/ml rhHsp70** ne uzrokuju različito lučenje LDH u medij iznad NHBE stanica u odnosu na netretirane stanice, no LDH izlučena nakon tretiranja kombinacijom LTA i 0,3 µg/ml rhHsp70 tijekom 24 sata značajno je niža od LDH izlučene nakon tretiranja NHBE stanica samom LTA i u odnosu na netretirane stanice. LDH izlučena nakon tretiranja stanica kombinacijom LPS-a i 0,3 µg/ml rhHsp70 također je značajno niža u odnosu na LDH izlučene iz netretiranih stanica, no izračunate interakcije nisu značajne (slika 4.1.12.).



**Slika 4.1.12.** Grafički prikaz utjecaja LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad NHBE stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=4$ ).

(a) Katalitička aktivnost LDH u mediju iznad NHBE stanica tretiranih LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na LTA

(b) Utjecaj interakcija LPS-a ili LTA i rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

#### 4.1.4.3. Utjecaj LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica plućnog epitela

##### NCI-H292 stanice:

Stanice su tretirane s 0,1 µg/ml LPS-a i 1 µg/ml LTA tijekom 2, 4, 6 i 8 h (n=3). LPS i LTA nisu značajno aktivirali kaspaze-3/7, -8 i -9 ni u jednoj vremenskoj točki te zbog toga dalje nisu ispitivani učinci kombinacija LPS-a ili LTA s rhHsp70 na njihovu aktivnost (podaci nisu prikazani).

##### NHBE stanice:

Stanice su tretirane s 0,1 µg/ml LPS-a i 1 µg/ml LTA te njihovim kombinacijama s 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 2 i 8 h (n=3). LTA je u ovim stanicama značajno aktivirala **kaspaze-3/7** nakon tretiranja tijekom 2 h, dok se aktivnost kaspaza-3/7 nakon tretiranja kombinacijama rhHsp70 i LPS-a ili LTA nije značajno razlikovala od aktivnosti u netretiranim stanicama ni nakon 2 h ni nakon 8 h (tablica 4.1.2.). Izračunate interakcije između LTA i rhHsp70 nakon tretiranja tijekom 2 h ipak su antagonističkog tipa.

LPS, LTA kao i njihove kombinacije s rhHsp70 nisu imali značajan utjecaj na aktivnost **kaspaze-8** i **kaspaze-9** u ispitivanim uvjetima.

**Tablica 4.1.2.** Aktivnost kaspaza-3/7 u NHBE stanicama tretiranim s rhHsp70, LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama.

	<b>KASPAZE-3/7</b>	
	<b>2 h</b>	<b>8 h</b>
<b>Hsp70</b>	112,40 ± 8,81	124,00 ± 39,93
<b>LPS</b>	117,90 ± 9,52	85,40 ± 1,26
<b>LPS + Hsp70</b>	121,33 ± 1,39	81,30 ± 3,30
<b>LTA</b>	<b>139,70 ± 12,50*</b>	89,19 ± 15,62
<b>LTA + Hsp70</b>	95,70 ± 2,78	90,12 ± 12,50

Rezultati su prikazani kao % od aktivnosti kaspaze u netretiranim stanicama.

\*statistički značajan (P<0,05) u odnosu na netretirane stanice

#### **4.1.5. Ispitivanje upalnog djelovanja ekstrakta dima cigareta (CSE) u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela**

##### ***4.1.5.1. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na NCI-H292 staničnoj liniji***

Dim cigareta jedan je od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a. Da bi se ispitalo njegovo djelovanje na staničnim modelima KOPB-a, pripremljen je ekstrakt dima cigareta na način opisan u poglavlju 3.4.2. Na temelju prethodnih istraživanja u kojima su ispitana djelovanja različitih koncentracija CSE-a (2,5, 5, 10, 15 i 20 %) odabrane su dvije koncentracije CSE-a za tretiranje stanica u daljnjim ispitivanjima, 2,5 i 15 %. Stanice su istodobno tretirane kombinacijama CSE-a s rhHsp70 kako bi se ispitala mogućnost modulacije upalnog djelovanja rhHsp70, a čime bi se oponašala moguća *in vivo* situacija koja se razvija kod pušača s KOPB-om ili rizikom za KOPB.

NCI-H292 stanice tretirane su s 2,5 % i 15 % CSE-a ili njegovom kombinacijom s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 tijekom 24 h (koncentracije rhHsp70 za kombinirana tretiranja odabrane su na temelju rezultata individualnih tretiranja s rhHsp70). Citokini IL-1α, IL-6 i IL-8 izmjereni su u mediju iznad stanica. Interakcije između rhHsp70 i CSE-a dobivene su matematičko-statističkim modelom koji se primjenjuje za kombinirane eksperimente. Ovaj model predviđa kombinirana djelovanja na način da uspoređuje izmjerena i očekivana djelovanja kombiniranih tretiranja.

##### **IL-1α:**

**2,5 % CSE u kombinaciji** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 ne potiče značajno lučenje IL-1α u odnosu na netretirane stanice, za razliku od individualnog tretiranja 2,5 % CSE-om. Koncentracije IL-1α značajno se razlikuju od IL-1α izlučenog nakon tretiranja samo s 2,5 % CSE-a te su interakcije između 2,5% CSE-a i rhHsp70 antagonističkog tipa.

**15 % CSE sam i u kombinaciji** s 0,3 i 3 µg/ml rhHsp70 potiče značajno lučenje IL-1α u odnosu na netretirane stanice, ali se IL-1α izlučen nakon tretiranja stanica kombinacijom rhHsp70 i 15 % CSE-a ne razlikuje značajno od IL-1α izlučenog nakon tretiranja samim 15 % CSE-om ni za jednu kombinaciju. Ipak, interakcije između 15 % CSE-a i rhHsp70 antagonističkog su tipa za 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (slika 4.1.13. a, b).

##### **IL-6:**

**2,5 % CSE u kombinaciji** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 ne potiče značajno lučenje IL-6 u NCI-H292 stanicama u odnosu na netretirane stanice za razliku od samog 2,5 % CSE-a. Ove



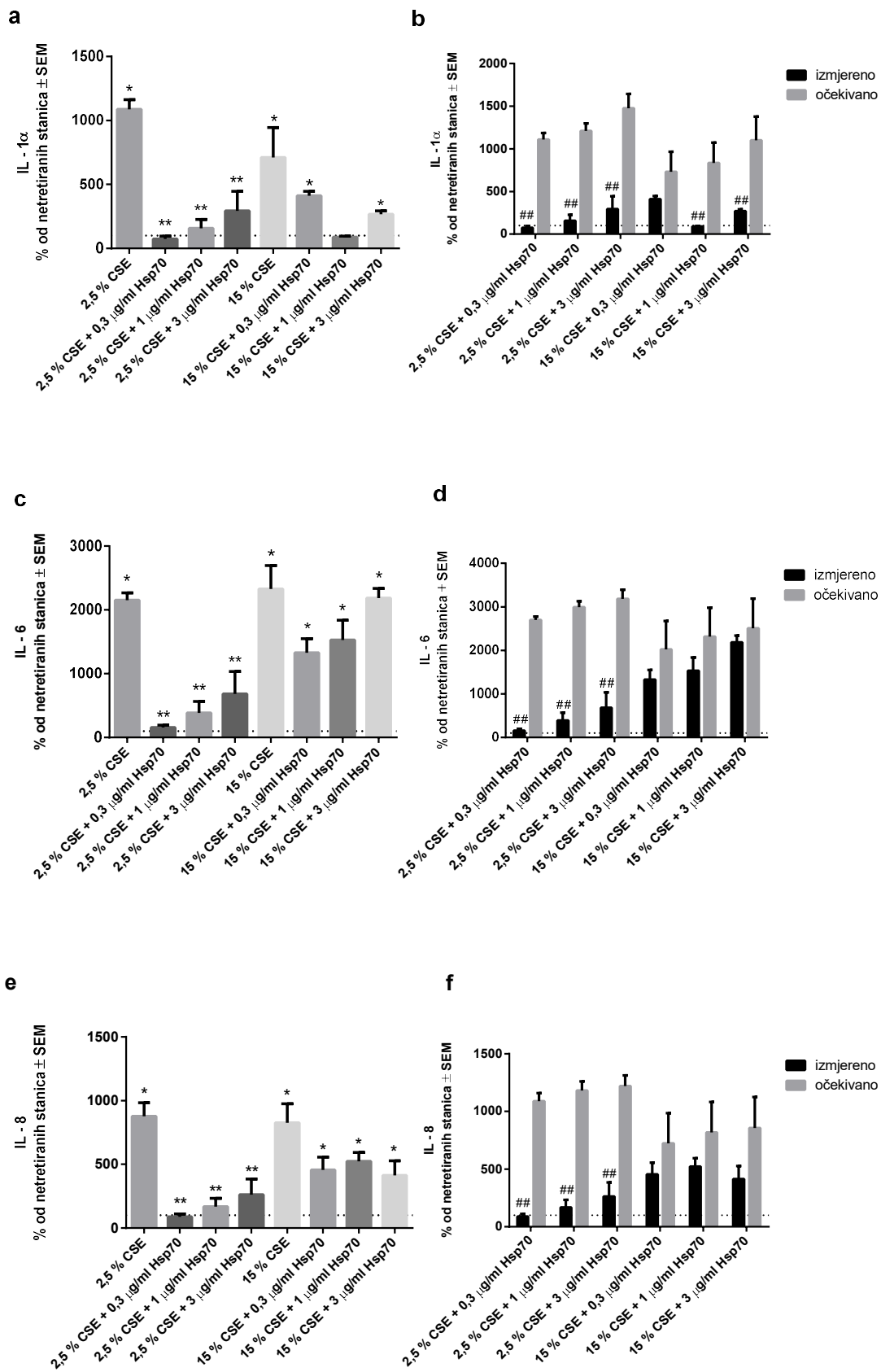
koncentracije značajno se razlikuju od IL-6 izlučenog nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om te su interakcije između 2,5 % CSE-a i rhHsp70 antagonističkog tipa.

**15 % CSE sam i u kombinaciji** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 uzrokuje značajno lučenje IL-6 u odnosu na netretirane stanice, dok između IL-6 izlučenog nakon tretiranja samo s 15 % CSE-om i kombinacijama 15 % CSE-a i rhHsp70 nema razlike, ni značajnih interakcija (slika 4.1.13. c, d).

#### **IL-8:**

**2,5 % CSE u kombinaciji** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 ne uzrokuje značajno više lučenje IL-8 u NCI-H292 stanicama u odnosu na netretirane stanice za razliku od samog 2,5 % CSE-a. Ove se koncentracije značajno razlikuju od IL-8 izlučenog nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om te su izračunate interakcije antagonističkog tipa.

**15 % CSE sam i u kombinaciji** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 uzrokuje značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice. Koncentracije IL-8 izlučenog nakon kombiniranih tretiranja ne razlikuju se od koncentracija IL-8 izlučenog nakon tretiranja stanica samim 15 % CSE te nema ni značajnih interakcija između 15 % CSE-a i rhHsp70 (slika 4.1.13. e, f).



**Slika 4.1.13.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-1 $\alpha$  (a, b), IL-6 (c, d) i IL-8 (e, f) iz NCI-H292 stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

(a, c, e) Lučenje IL-1 $\alpha$  (a), IL-6 (c) i IL-8 (e) nakon tretiranja stanica tijekom 24 h samim CSE-om i kombinacijom CSE-a i rhHsp70.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(b, d, f) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-1 $\alpha$  (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

#### ***4.1.5.2. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim stanicama plućnog epitela***

Primarne stanice plućnog epitela tretirane su s 2,5 i 15 % CSE-a i njegovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 24 h. Citokini IL-1α, IL-6 i IL-8 izmjereni su u mediju iznad stanica ELISA metodom.

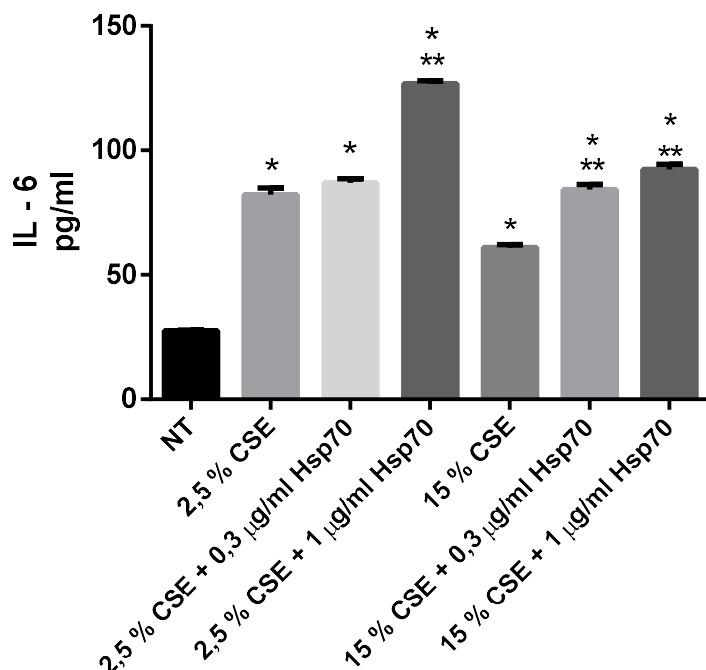
##### **NHBE stanice:**

**IL-1α:** Tretiranje 2,5 i 15 % CSE-om blago je snizilo koncentraciju IL-1α izlučenog u medij iznad stanica, ali to nije bilo statistički značajno. Kombinirano tretiranje NHBE stanica s CSE-om i rhHsp70, nije uzrokovalo značajno različito lučenje IL-1α u odnosu na netretirane stanice, niti na sam CSE. Ipak, koncentracija IL-1α izlučena nakon tretiranja stanica kombinacijom 15 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 značajno je viša od očekivane (izračunate) koncentracije te je tip interakcije među njima sinergistički (podaci nisu prikazani).

**IL-6: 2,5 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70** uzrokuje značajno lučenje IL-6 u odnosu na netretirane stanice, a ono je i značajno više u odnosu na sam 2,5 % CSE za kombinaciju 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70, no izračunate interakcije nisu značajne.

**15 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70** također uzrokuje značajno lučenje IL-6 u odnosu na netretirane stanice, a ono je i značajno više u odnosu na sam 15 % CSE za kombinirana tretiranja, no izračunate interakcije također nisu značajne (slika 4.1.14.).

**IL-8:** Lučenje IL-8 potaknuto je samo s 15 % CSE-a, dok kombinirano tretiranje NHBE stanica s CSE-om i rhHsp70 nije uzrokovalo značajno različito lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice ili na sam CSE ni za jednu kombinaciju te nema značajnih interakcija (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.1.14.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-6 iz NHBE stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=4).

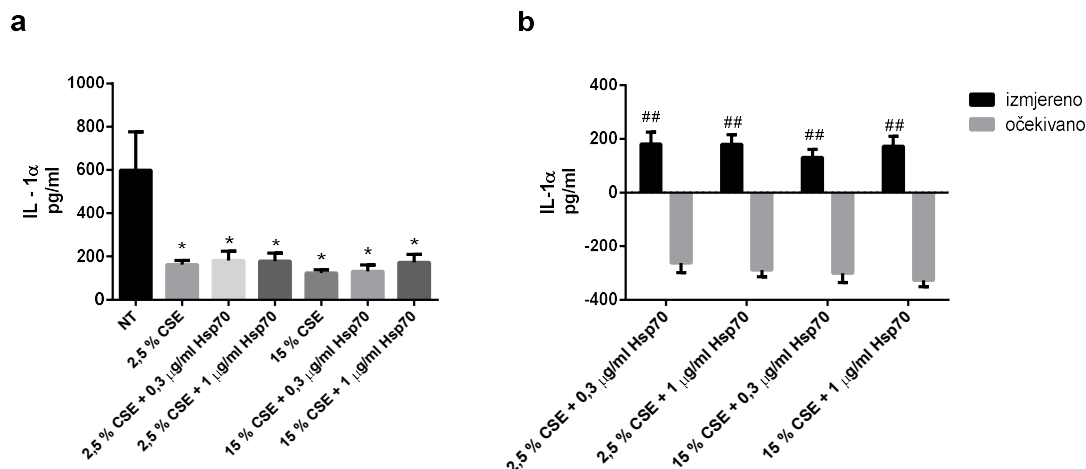
\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

#### **PBEC stanice:**

**IL-1 $\alpha$ :** 2,5 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 uzrokuje smanjeno lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, no ono se ne razlikuje od IL-1 $\alpha$  izlučenog nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om za kombinirana tretiranja. Izračunati tip interakcije antagonističan je za sve kombinacije. **15 % CSE sam i u kombinaciji** s 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 također uzrokuje smanjeno lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, a lučenje nakon kombiniranih tretiranja ne razlikuje se u odnosu na tretiranje samim 15 % CSE-om. Izračunati tip interakcije također je antagonističan (slika 4.1.15.).

**IL-6 i IL-8:** 2,5 % CSE potiče značajno lučenje IL-6, dok i 2,5 % CSE i 15 % CSE potiču značajno lučenje IL-8. Kombinirano tretiranje PBEC stanica s CSE-om i rhHsp70 nije uzrokovalo značajno različito lučenje IL-6 i IL-8 u odnosu na netretirane stanice ili na sam CSE ni za jednu kombinaciju te nema značajnih interakcija (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.1.15.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-1α iz PBEC stanica izoliranih iz zdravih ispitanika i tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=4).

(a) Lučenje IL-1α nakon tretiranja stanica tijekom 24 h CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70. NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

(b) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-1α. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

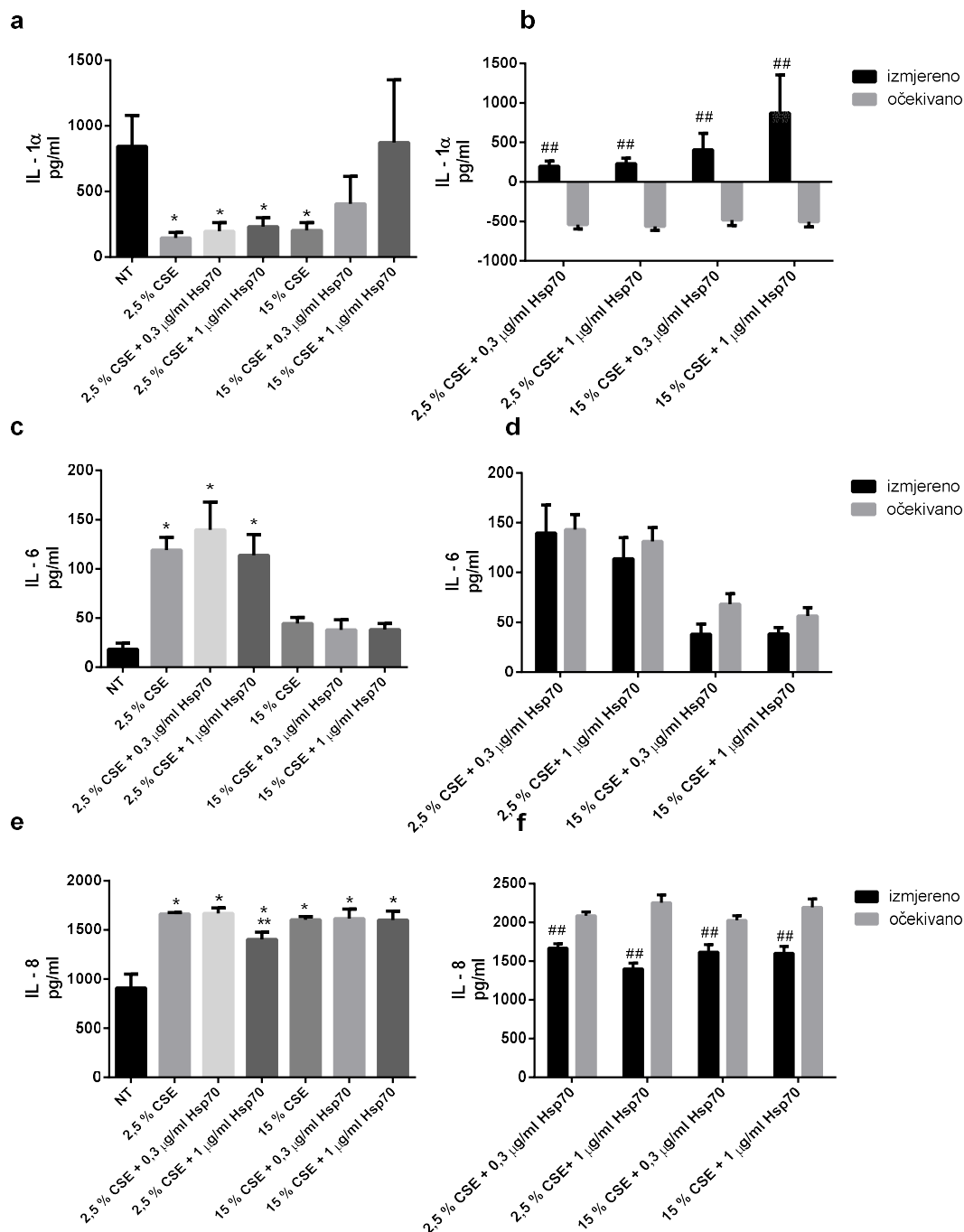
#### PBEC KOPB stanice:

**IL-1α: 2,5 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1 μg/ml rhHsp70** uzrokuje smanjeno lučenje IL-1α u odnosu na netretirane stanice, no nakon kombiniranih tretiranja ono se ne razlikuje od IL-1α izlučenog nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om. Izračunati tip interakcije antagonističan je za sve kombinacije. **15 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1 μg/ml rhHsp70** ne uzrokuje značajno različito lučenje IL-1α u odnosu na netretirane stanice niti je ono nakon kombiniranih tretiranja različito u odnosu na tretiranje samim 15 % CSE-om. Ipak, izračunati tip interakcije antagonističan je (slika 4.1.16. a, b).

**IL-6: 2,5 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1 μg/ml rhHsp70** uzrokuje značajno lučenje IL-6 u odnosu na netretirane stanice, no ono se nakon kombiniranih tretiranja ne razlikuje od IL-6 izlučenog nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om, a nema niti značajnih izračunatih interakcija. Kombinirao tretiranje PBEC KOPB stanica s **15 % CSE-a i rhHsp70** nije uzrokovalo značajno različito lučenje IL-6 u odnosu na netretirane stanice i na sam CSE ni za jednu kombinaciju te nema značajnih interakcija (slika 4.1.16. c, d).

**IL-8: 2,5 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70** uzrokuje značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice. Nakon kombiniranih tretiranja IL-8 značajno je viši u odnosu na IL-8 izlučen nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om za kombinaciju 2,5 % CSE-a i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70. Izračunate interakcije antagonističkog su tipa.

**15 % CSE sam i u kombinaciji s 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70** također uzrokuje značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice. Nakon kombiniranih tretiranja nema značajne razlike u odnosu na sam 15 % CSE. Ipak, izračunate interakcije su antagonističkog tipa (slika 4.1.16. e, f).



**Slika 4.1.16.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na lučenje citokina iz PBEC stanica izoliranih iz bolesnika s KOPB-om i tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, c, e) Lučenje IL-1α (a), IL-6 (c) i IL-8 (e) nakon tretiranja stanica tijekom 24 h samim CSE-om i kombinacijama CSE-a s rhHsp70. NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(b, d, f) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-1α (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak



#### **4.1.6. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama plućnog epitela**

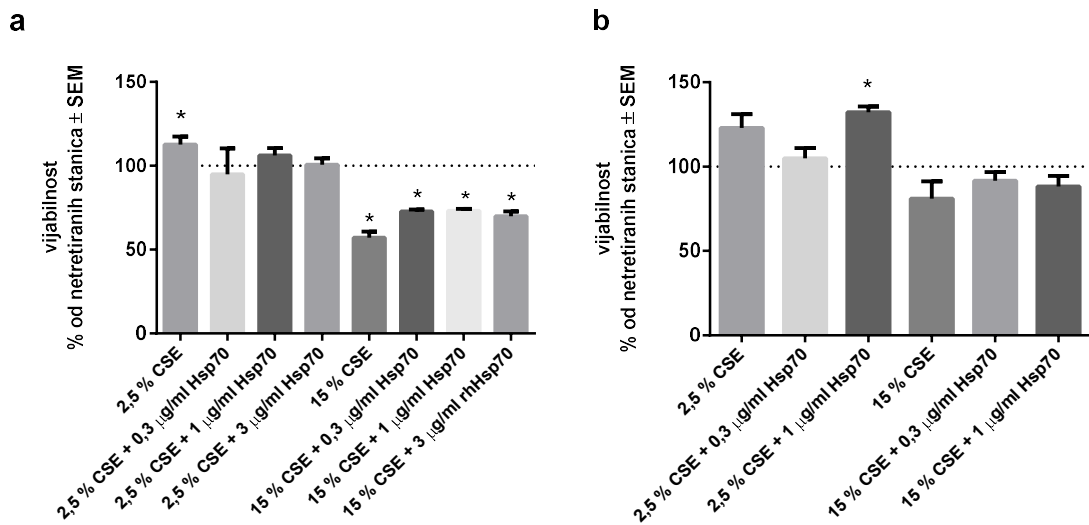
Citotoksičnost djelovanja CSE-a te njegovih kombinacija s rhHsp70 na NCI-H292 i NHBE stanicama ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTS testom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica te određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama.

##### ***4.1.6.1. Utjecaj CSE-a i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica plućnog epitela (MTS test)***

Stanice su tretirane tijekom 24 h s 2,5 ili 15 % CSE-a te njegovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (NCI-H292 stanice), odnosno s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 (NHBE stanice).

**2,5 % CSE** uzrokovao je povećanje vijabilnosti **NCI-H292** stanica u odnosu na netretirane stanice, a kombinacije 2,5 % CSE-a i rhHsp70 nisu imale značajnog utjecaja na vijabilnost NCI-H292 stanica te izračunate interakcije nisu bile značajne. **15 % CSE**, kao i njegove kombinacije s rhHsp70, uzrokovale su značajno smanjenje vijabilnosti NCI-H292 stanica u odnosu na netretirane stanice. Izračunate interakcije između ovih kombinacija nisu bile značajne.

2,5 % i 15 % CSE nisu značajno utjecali na vijabilnost **NHBE** stanica u odnosu na netretirane stanice, kao ni njihove kombinacije s rhHsp70, osim dvojnog tretiranja s 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 koje je povećalo vijabilnost NHBE stanica. Izračunate interakcije između ovih kombinacija nisu bile značajne (slika 4.1.17.).



**Slika 4.1.17.** Grafički prikaz vijabilnosti NCI-H292 (a) i NHBE (b) stanica tretiranih CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

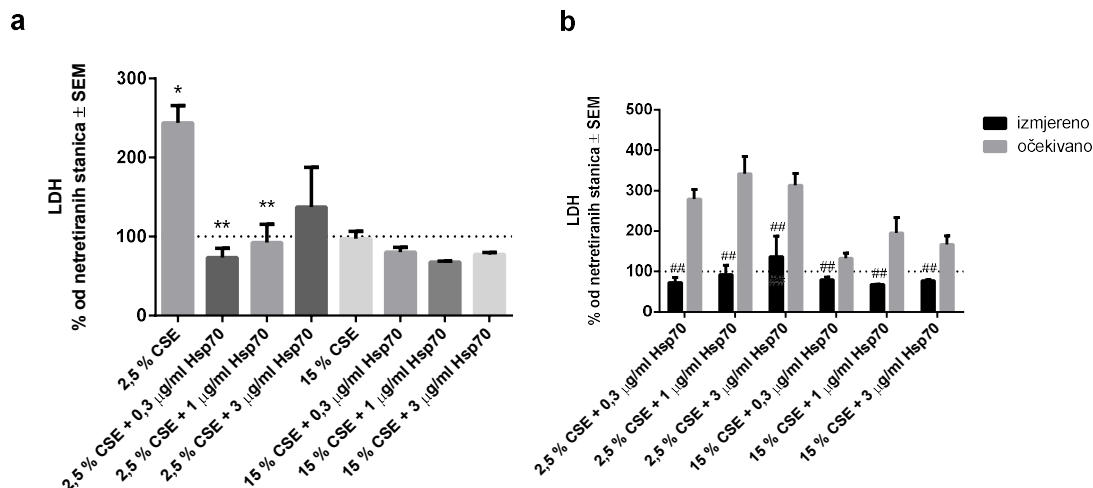
#### 4.1.6.2. Utjecaj CSE-a i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica plućnog epitela

NCI-H292 i NHBE stanice tretirane su s 2,5 i 15 % CSE-a i njegovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (NCI-H292 stanice), odnosno s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 (NHBE stanice) tijekom 24 h.

##### NCI-H292 stanice:

**Kombinacije 2,5 % CSE-a i rhHsp70** ne dovodi do značajno različitog lučenja LDH u odnosu na netretirane NCI-H292 stanice za razliku od samog 2,5 % CSE-a. Aktivnost LDH izlučene u medij iznad stanica značajno se razlikuje za stanice tretirane kombinacijom 2,5 % CSE-a s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 u odnosu na sam CSE te su ove interakcije značajno antagonističke, kao i ona za kombinaciju s 3 µg/ml rhHsp70.

**Kombinacije 15 % CSE-a s rhHsp70** ne potiču značajno izlučivanje LDH u odnosu na netretirane stanice, kao ni na sami 15 % CSE. Ipak, izračunate interakcije značajno su antagonističke (slika 4.1.18.).



**Slika 4.1.18.** Grafički prikaz utjecaja CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad NCI-H292 stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=4$ ).

(a) Katalitička aktivnost LDH u mediju iznad NCI-H292 stanica tretiranih CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

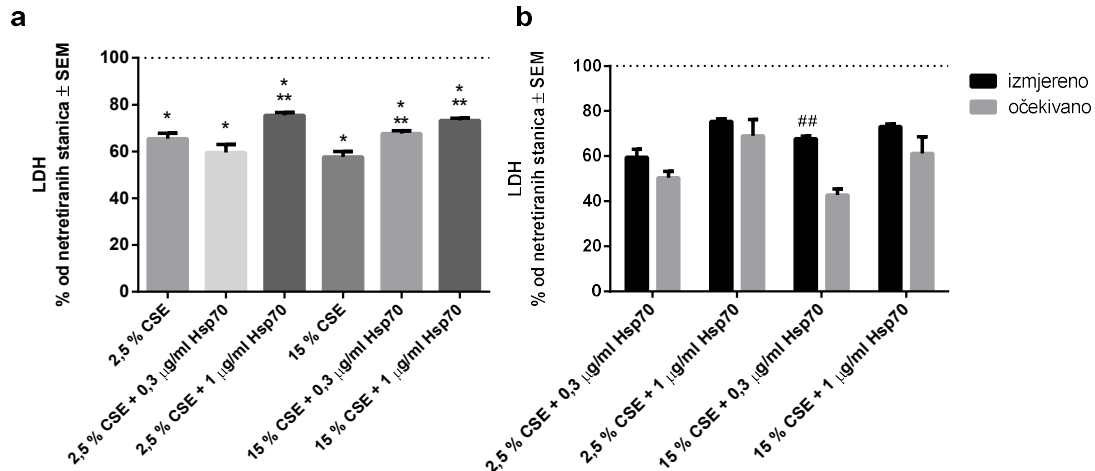
\*\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na CSE

(b) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad stanica. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P<0,05$ ) antagonistički učinak

#### NHBE stanice:

Tretiranje NHBE stanica s 2,5 ili 15 % CSE-a dovodi do značajno smanjenog otpuštanja LDH u medij iznad stanica u odnosu na netretirane stanice, kao i nakon tretiranja kombinacijama 2,5 ili 15 % CSE-a s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70. Kombinacija 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 uzrokuje značajno višu aktivnost LDH u mediju iznad stanica od samog 2,5 % CSE-a, kao i kombinacija 15 % CSE-a s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70, no samo kombinacija 15 % CSE-a i 0,3 µg/ml rhHsp70 pokazuje značajne interakcije antagonističkog tipa (slika 4.1.19.).



**Slika 4.1.19.** Grafički prikaz utjecaja CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad NHBE stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=4).

(a) Katalitička aktivnost LDH u mediju iznad NHBE stanica tretiranih CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(b) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad stanica. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

#### 4.1.6.3. Utjecaj CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica plućnog epitela

**NCI-H292 stanice:**

##### Kaspaze-3/7

Stanice su tretirane s 2,5 i 15 % CSE-a te njegovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 2 i 8 h (n=3). **2,5 % CSE** nakon 8 h značajno je smanjio aktivaciju kaspaze-3/7.

**Kombinacije 2,5 % CSE-a i rhHsp70** nisu dovele do aktivacije kaspaze-3/7 u odnosu na netretirane stanice nakon 2 i 8 h. Aktivnosti nakon 2 h nisu se razlikovale od aktivnosti ovih kaspaza u stanicama tretiranim samim CSE-om i nije bilo značajnih interakcija. Nakon 8 h aktivnost kaspaze-3/7 bila je značajno snižena nakon tretiranja 2,5 % CSE-om i 1 µg/ml rhHsp70 u odnosu na netretirane stanice, no nije se razlikovala od aktivnosti nakon tretiranja samim CSE-om, dok je aktivnost nakon tretiranja 2,5 % CSE-om i 0,3 µg/ml rhHsp70 bila značajno viša u odnosu na aktivnost kaspaze-3/7 u stanicama tretiranim samo 2,5 % CSE-om.

**15 % CSE** aktivirao je kaspaze-3/7 nakon 2 i 8 h. **Kombinacije 15 % CSE-a i rhHsp70**

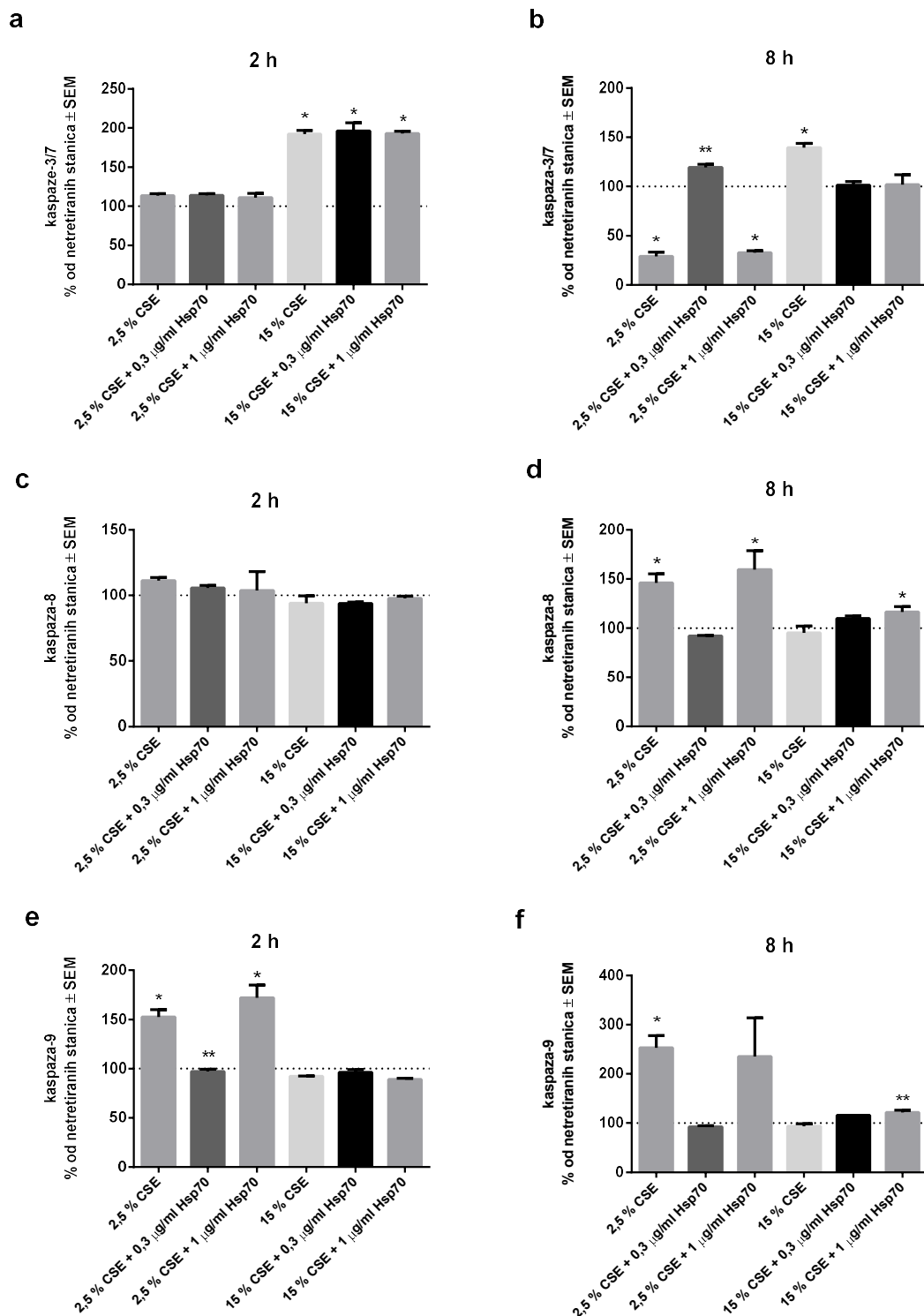
uzrokuju značajno povišenu aktivnost kaspaza-3/7 nakon tretiranja tijekom 2 h, no ova aktivnost se ne razlikuje od aktivnosti kaspaza-3/7 uzrokovane tretiranjem samim CSE-om. Nakon 8 h ne dolazi do značajne aktivacije kaspaza-3/7 nakon tretiranja kombinacijama 15 % CSE-a i rhHsp70 te se aktivnost ne razlikuje značajno od one uzrokovane tretiranjem NCI-H292 stanica samim 15 % CSE-om (slika 4.1.20. a, b).

### **Kaspaza-8**

Nakon tretiranja stanica tijekom 2 h nije došlo do aktivacije kaspaze-8 u odnosu na netretirane stanice ni pod jednim ispitivanim uvjetom. No nakon 8 h **2,5 % CSE** uzrokovao je značajnu aktivaciju kaspaze-8. **Kombinacija 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70** također je dovela do značajne aktivacije kaspaze-8, ali se aktivnost nije razlikovala od one dobivene nakon tretiranja stanica samim CSE-om te nije bilo značajnih izračunatih interakcija. **Kombinacija 15 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70** uzrokovala je značajnu aktivaciju kaspaze-8, no ona se također nije razlikovala od one dobivene nakon tretiranja stanica samim CSE-om te nije bilo značajnih izračunatih interakcija (slika 4.1.20. c, d).

### **Kaspaza-9**

**2,5 % CSE** potaknuo je aktivaciju kaspaze-9 u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja tijekom 2 i 8 h. **Kombinacija 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70** uzrokovala je značajnu aktivaciju kaspaze-9 u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja tijekom 2 h, no ona se nije razlikovala od aktivnosti kaspaze-9 dobivene nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om. Aktivnost kaspaze-9 nakon tretiranja stanica kombinacijom 2,5 % CSE-a i 0,3 µg/ml rhHsp70 bila je značajno niža od one dobivene nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om, no nije bilo značajnih izračunatih interakcija. **Kombinacija 15 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70** uzrokuje značajno višu aktivaciju kaspaze-9 nakon tretiranja tijekom 8 h u odnosu na aktivnost dobivenu nakon tretiranja samim 15 % CSE-om, no ona se ne razlikuje od aktivnosti dobivene u netretiranim stanicama i nema značajnih interakcija (slika 4.1.20. e, f).



**Slika 4.1.20.** Aktivnost kaspaze-3/7 (a, b), kaspaze-8 (c, d) i kaspaze-9 (e, f) u NCI-H292 stanicama tretiranim CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 2 i 8 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

**NHBE stanice:**

Stanice su tretirane s 2,5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 2 i 8 h (n=3). Došlo je do aktivacije **kaspaza-3/7** samo nakon tretiranja kombinacijom 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 te 15 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 nakon 2 h u odnosu na netretirane stanice. CSE kao i njegove kombinacije s rhHsp70 nisu imali značajan utjecaj na aktivnost **kaspaze-8** i **kaspaze-9** u ispitivanim uvjetima (podaci nisu prikazani).

## **4.2. ISPITIVANJE UPALNOG I CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA IZVANSTANIČNOG Hsp70 NA STANICAMA MONOCITNO-MAKROFAGNOG SUSTAVA**

Ispitana su upalna i citotoksična djelovanja izvanstaničnog Hsp70 na THP-1 staničnoj liniji (humani monociti iz periferne krvi porijeklom od bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom) te na monocitima izoliranim iz periferne krvi zdravih osoba (primarne stanice). THP-1 stanice smo u svim ispitivanjima provedenim u ovom radu prije tretiranja diferencirali u makrofage tijekom 48 sati pomoću 20 nM PMA.

Monocyte porijeklom iz periferne krvi smo u svim ispitivanjima provedenim u ovom radu prije tretiranja diferencirali u makrofage tijekom 7 dana pomoću 25 ng/ml M-CSF-a. Ipak, u daljnjem tekstu ovoga rada smo ovako diferencirane monocyte zbog jednostavnosti u pisanju i u razumijevanju označavali samo kao „monociti“.

Rekombinantni humani Hsp70 protein korišten je za tretiranje THP-1 stanica i monocita.

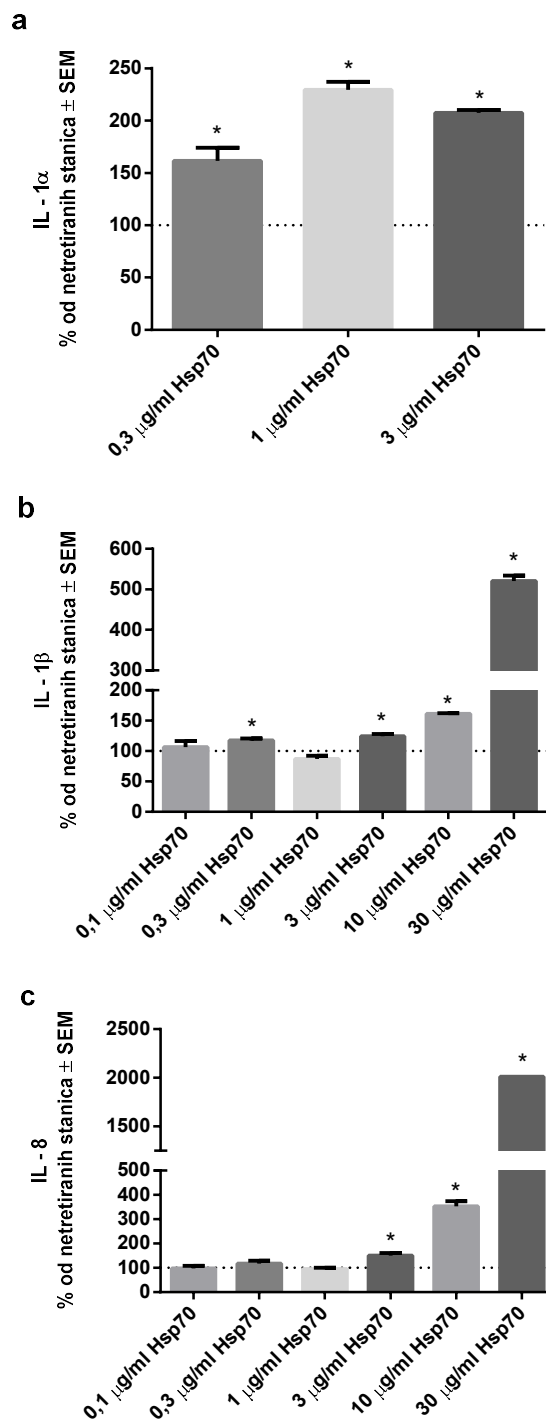
### **4.2.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava**

#### ***4.2.1.1. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na THP-1 staničnoj liniji***

Koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  određivana je u mediju iznad THP-1 stanica nakon tretiranja s 0,1, 0,3, 1, 3, 10 i 30  $\mu$ g/ml rhHsp70 tijekom 24 h. Koncentracije citokina izlučene iz netretiranih (kontrolnih) stanica izražene su kao 100 %, a koncentracije citokina izlučene iz tretiranih stanica kao udio (%) u odnosu na netretirane stanice.

rhHsp70 u koncentraciji od 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/ml inducirao je značajno izlučivanje **IL-1 $\alpha$**  u odnosu na netretirane stanice, ali za ostale primijenjene koncentracije nije se mogao detektirati IL-1 $\alpha$  korištenim ELISA test paketima (0,1, 10 i 30  $\mu$ g/ml rhHsp70). Izlučivanje **IL-1 $\beta$**  bilo je značajno povišeno nakon tretiranja s 0,3, 3, 10 i 30  $\mu$ g/ml rhHsp70 u odnosu na netretirane stanice, dok je značajno povišeno izlučivanje **IL-8** potaknuto s 3, 10 i 30  $\mu$ g/ml rhHsp70 (slika 4.2.1.). rhHsp70 nije potaknuo lučenje **IL-6** i **TNF- $\alpha$** .





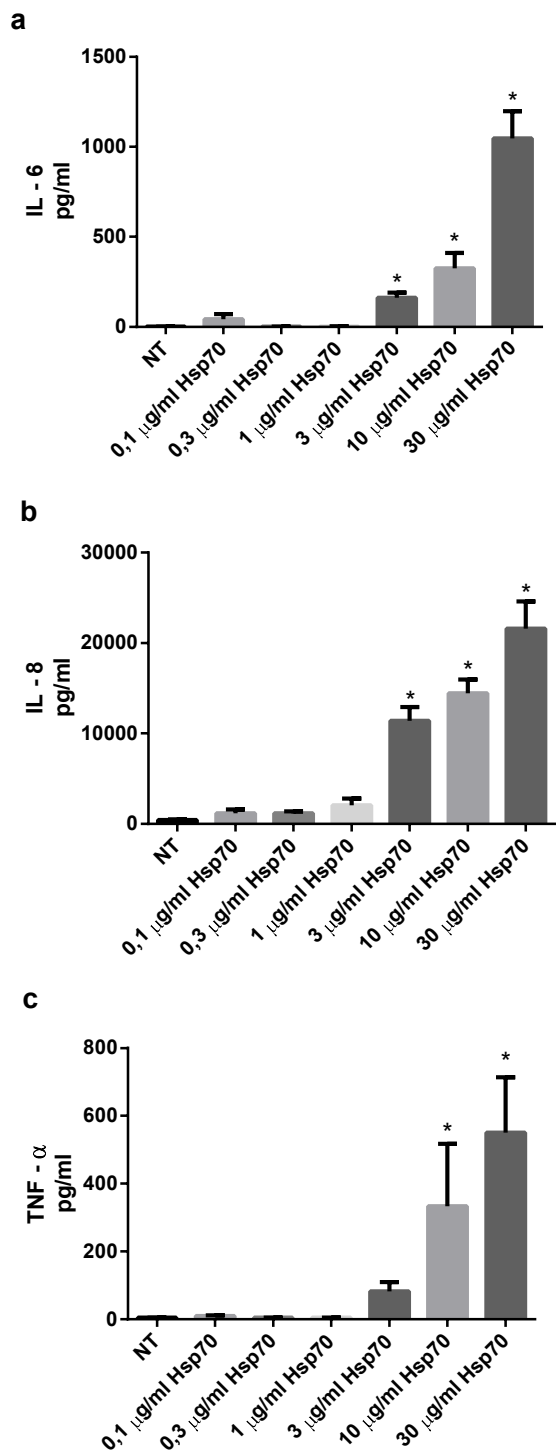
**Slika 4.2.1.** Grafički prikaz citokina IL-1 $\alpha$  (a), IL-1 $\beta$  (b) i IL-8 (c) izlučenih iz THP-1 stanica nakon tretiranja s rhHsp70 tijekom 24. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### ***4.2.1.2. Ispitivanje upalnog djelovanja rhHsp70 na primarnim monocitima***

Monociti su tretirani različitim koncentracijama rhHsp70 (0,1-30 µg/ml) te su određivane koncentracije IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  izlučene u medij iznad stanica. Monociti su izolirani od različitih donora (n=3) te su stoga zbog mogućih značajnih interindividualnih razlika koncentracije citokina izlučene iz njih u medij izražene u apsolutnim vrijednostima tj. u pg/ml (a ne u relativnim kao kod THP-1 stanične linije tj. kao udio u odnosu na netretirane stanice).

rhHsp70 potaknuo je značajno lučenje **IL-6** u koncentraciji 3, 10 i 30 µg/ml, jednake koncentracije rhHsp70 također su inducirale lučenje **IL-8**, dok je značajno izlučivanje **TNF- $\alpha$**  bilo potaknuto s 10 i 30 µg/ml rhHsp70 (slika 4.2.2.). **IL-1 $\alpha$**  i **IL-1 $\beta$**  nisu se mogli detektirati korištenim ELISA test paketima.



**Slika 4.2.2.** Grafički prikaz citokina IL-6 (a), IL-8 (b) i TNF- $\alpha$  (c) izlučenih iz monocita nakon tretiranja s rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3). NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### 4.2.2. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava

Citotoksičnost djelovanja rhHsp70 na THP-1 stanice te monocite ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTS testom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica te određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama.

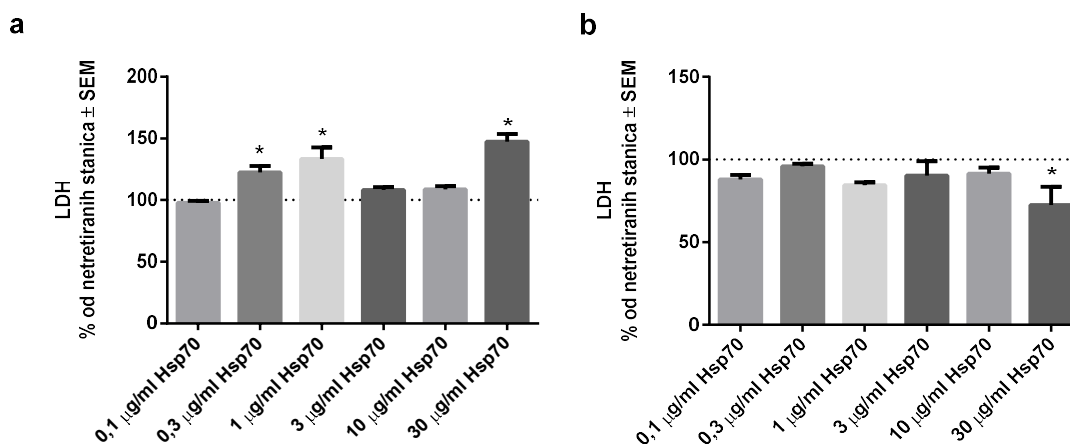
##### 4.2.2.1. Utjecaj rhHsp70 na vijabilnost stanica monocitno-makrofagnog sustava (MTS test)

Stanice su tretirane različitim koncentracijama rhHsp70 (0,1-30  $\mu\text{g/ml}$ ) tijekom 24 h. Rezultati su izraženi kao udio (%) vijabilnosti tretiranih stanica u odnosu na netretirane stanice, čija je vijabilnost izražena kao 100 %. rhHsp70 nije utjecao na metaboličku aktivnost THP-1 stanica i monocita (podaci nisu prikazani).

##### 4.2.2.2. Utjecaj rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica monocitno-makrofagnog sustava

THP-1 stanice i monociti tretirani su s 0,1-30  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su izraženi kao udio (%) aktivnosti LDH izlučene u medij iznad tretiranih stanica u odnosu na LDH aktivnost u mediju iznad netretiranih stanica, koja je izražena kao 100 %.

U THP-1 stanicama koncentracije od 0,3, 1 i 30  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 dovode do značajnog otpuštanja LDH iz stanica u odnosu na netretirane stanice, dok 30  $\mu\text{g/ml}$  potiskuje otpuštanje LDH u medij iznad monocita (slika 4.2.3.).



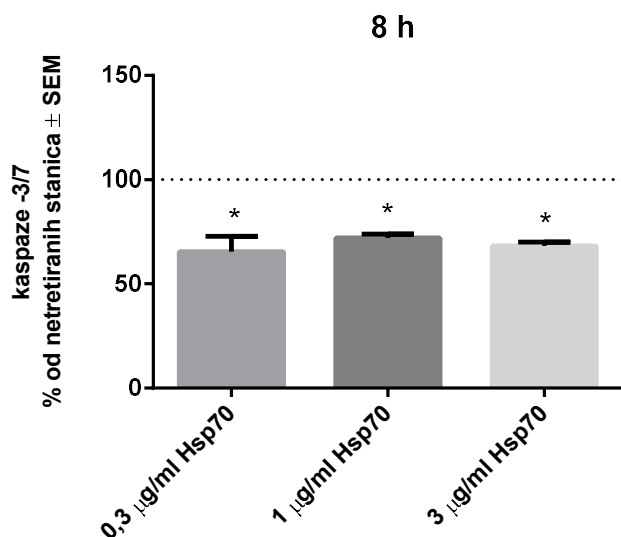
**Slika 4.2.3.** Grafički prikaz katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad THP-1 stanica (a) i monocita (b) tretiranih s rhHsp70 tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### 4.2.2.3. Utjecaj rhHsp70 na način umiranja stanica monocitno-makrofagnog sustava

##### THP-1 stanice:

Stanice su tretirane 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 tijekom 2, 4, 6 i 8 h. Navedene koncentracije odabrane su kako bi se ispitalo djelovanje rhHsp70 na aktivaciju procesa apoptoze u onim koncentracijama koje dovode do izlučivanja LDH (0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70) i citokina (osobito 3  $\mu\text{g/ml}$ , ali i 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70). Rezultati ( $n=3$ ) su izraženi kao udio (%) aktivnosti kaspaze u tretiranim stanicama u odnosu na aktivnost kaspaze u netretiranim stanicama, koja je izražena kao 100 %. Aktivnost **kaspaza-3/7** bila je značajno snižena u odnosu na netretirane stanice nakon 8 h za sve ispitivane koncentracije (slika 4.2.4.). **Kaspaza-8** i **kaspaza-9** nisu aktivirane nakon tretiranja s rhHsp70 ni u jednoj ispitivanoj vremenskoj točki.

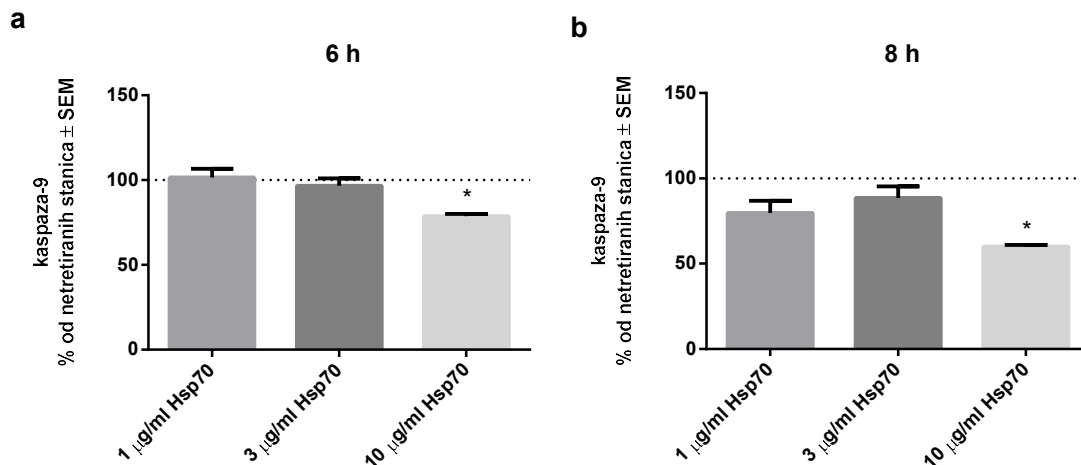


**Slika 4.2.4.** Aktivnost kaspaza-3/7 u THP-1 stanicama tretiranim s rhHsp70 tijekom 8 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=3$ ).

\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

##### Monociti:

Stanice su tretirane s 1, 3 i 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 tijekom 6 i 8 h. Navedene koncentracije su odabrane kako bi se ispitalo djelovanje rhHsp70 na aktivaciju procesa apoptoze u onim koncentracijama koje ne dovode (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ili dovode (3 i 10  $\mu\text{g/ml}$ ) do izlučivanja citokina. Pod navedenim uvjetima nije došlo do značajne aktivacije ili inhibicije **kaspaza-3/7** i **kaspaze-8** (podaci nisu prikazani), dok je 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 potisnuo aktivaciju **kaspaze-9** nakon 6 h i nakon 8 h (slika 4.2.5.).



**Slika 4.2.5.** Aktivnost kaspaze-9 u monocitima tretiranim s rhHsp70 tijekom 6 i 8 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

### 4.2.3. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava

#### 4.2.3.1. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na THP-1 staničnoj liniji

THP-1 stanice tretirane su LPS-om, LTA ili njihovom kombinacijom s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 tijekom 24 h (koncentracije rhHsp70 za kombinirana tretiranja odabrane su na temelju rezultata individualnih tretiranja s rhHsp70). Citokini IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  izmjereni su u mediju iznad stanica. Interakcije između rhHsp70 i LPS-a ili LTA dobivene su primjenom matematičko-statističkog modela za kombinirana tretiranja.

#### IL-1 $\alpha$ :

**Kombinacije LTA** i različitih koncentracija rhHsp70 nisu potaknule izlučivanje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, za razliku od samog LTA. Koncentracija IL-1 $\alpha$  u kombiniranim tretiranjima značajno se razlikovala od one kod tretiranja samo s LTA. Izračunate interakcije između LTA i svih ispitivanih koncentracija rhHsp70 bile su antagonističkog tipa (slika 4.2.6. a, b). **Kombinacije LPS-a** s rhHsp70 potaknule su značajno lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice, ali nije bilo razlike u koncentraciji IL-1 $\alpha$  u odnosu na onu izlučenu nakon tretiranja samo LPS-om. Izračunate interakcije također nisu bile značajne (podaci nisu prikazani).

### **IL-1 $\beta$ :**

**LPS-a sam i u kombinaciji** sa svim ispitivanim koncentracijama rhHsp70 potaknuo je značajno više lučenje IL-1 $\beta$  od netretiranih stanica, no za kombinirana tretiranja ove koncentracije nisu se razlikovale od IL-1 $\beta$  izlučenog iz THP-1 stanica tretiranih samo LPS-om. **LTA sam i u kombinaciji** s rhHsp70 potaknuo je značajno lučenje IL-1 $\beta$  u koncentraciji od 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70. Za sve kombinacije LTA i rhHsp70 koncentracija izlučenog IL-1 $\beta$  bila je značajno niža u odnosu na tretiranje samo s LTA, no računski dobivene interakcije nisu bile statistički značajne (podaci nisu prikazani).

### **IL-6:**

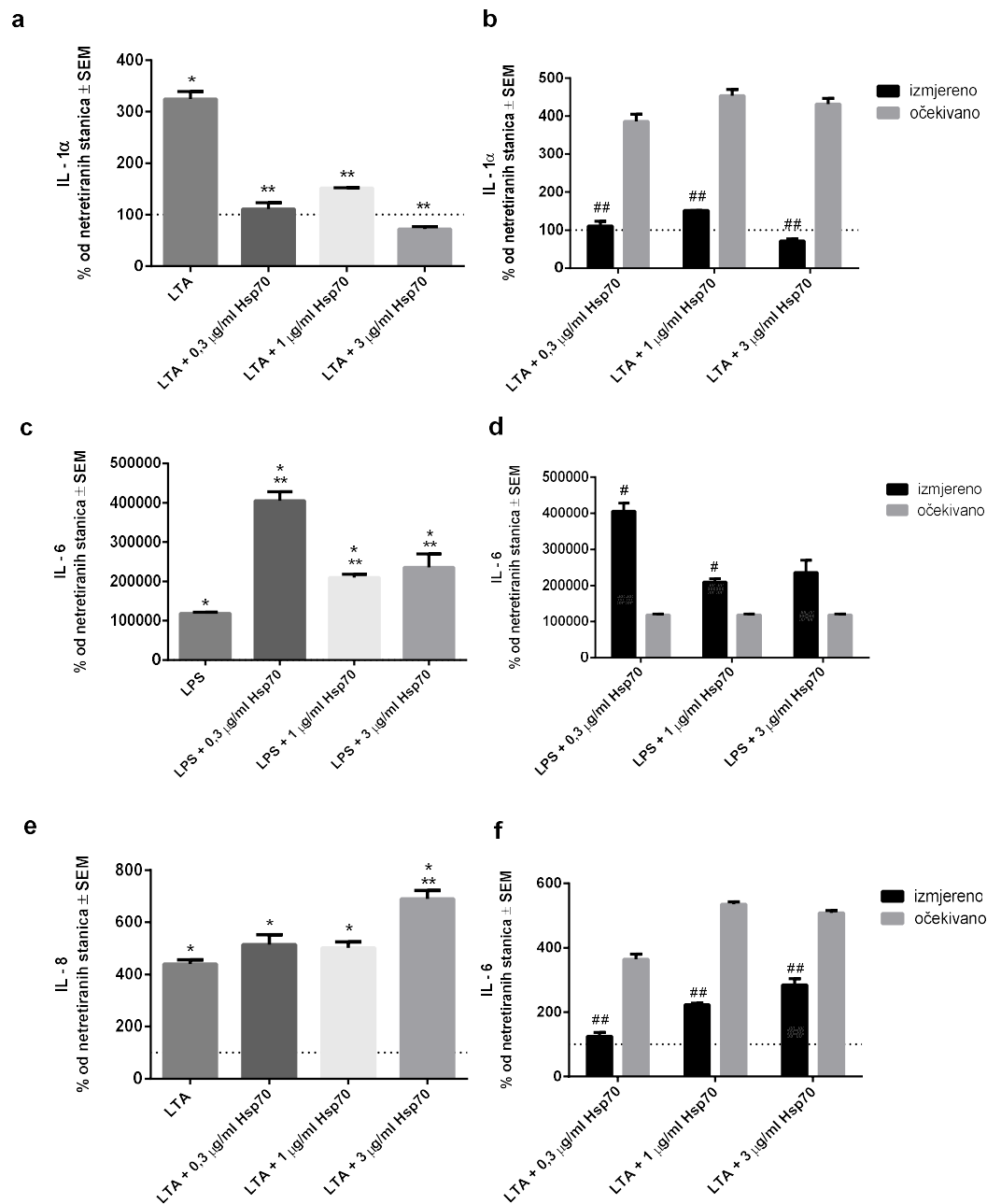
**LPS sam i u kombinaciji** s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokovao je snažno lučenje IL-6, koje se značajno razlikovalo od koncentracije IL-6 izlučene iz netretiranih stanica, a za kombinirana tretiranja ni od stanica koje su tretirane samim LPS-om. Ovaj učinak bio je sinergističkog tipa za kombinacije LPS-a s 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 (slika 4.2.6. c, d). **LTA ni njegove kombinacije** s rhHsp70 nisu potaknule značajne promjene u izlučivanju IL-6 (podaci nisu prikazani).

### **IL-8:**

**LPS, LTA i njihove kombinacije** s rhHsp70 potaknule su značajno više izlučivanje IL-8 u odnosu na netretirane stanice. Uz to, kombinacija 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 s LTA potaknula je jače lučenje IL-8 od samog LTA, ali je tip interakcije između rhHsp70 i LTA u ovom slučaju bio antagonističan, kao i za ostale ispitivane kombinacije LTA i rhHsp70 (slika 4.2.6. e, f). S druge strane, koncentracija IL-8 izlučenog u medij iznad THP-1 stanica nakon tretiranja kombinacijama LPS-a i rhHsp70 nije se značajno razlikovala od one izlučene nakon individualnog tretiranja LPS-om, no izračunata interakcija između 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 i LPS-a bila je antagonističkog tipa (podaci nisu prikazani).

### **TNF- $\alpha$ :**

**LPS, LTA i njihove kombinacije** s rhHsp70 potaknule su značajno lučenje TNF- $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. No, **kombinacije LPS-a** s rhHsp70 te **kombinacije LTA** s rhHsp70 nisu potaknule značajno različito lučenje TNF- $\alpha$  od individualnih tretiranja LPS-om ili s LTA. Usprkos tome, izračunate interakcije pokazuju sinergizam između LPS-a ili LTA i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.2.6.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije LPS-a ili LTA s rhHsp70 na lučenje IL-1α (a, b), IL-6 (c, d) i IL-8 (e, f) iz THP-1 stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, c, e) Lučenje IL-1α (a), IL-6 (c) i IL-8 (e) nakon tretiranja tijekom 24 h samim LPS-om ili LTA i kombinacijom LPS-a ili LTA s rhHsp70.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LPS ili LTA

(b, d, f) Utjecaj interakcija rhHsp70 i LTA na lučenje IL-1α (b), IL-6 (d) i IL-8 (f). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

# statistički značajan ( $P < 0,05$ ) sinergistički učinak

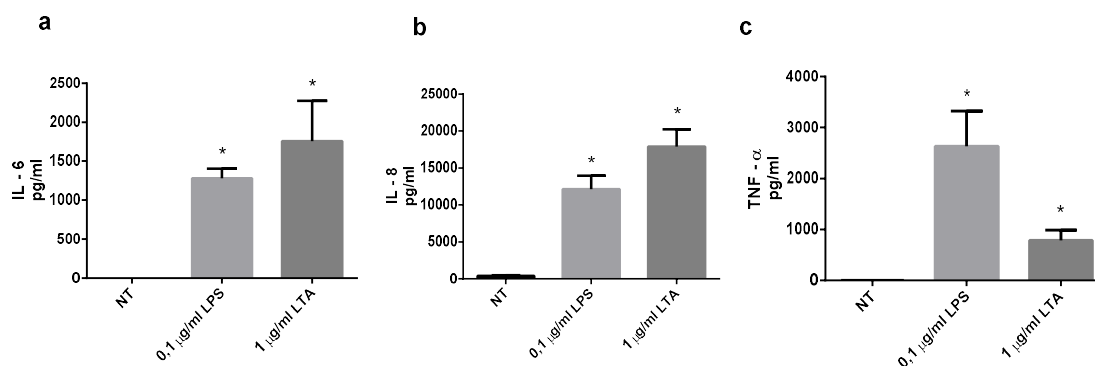
## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak



#### 4.2.3.2. Ispitivanje upalnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim monocitima

Monociti su tretirani s 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS-a, 1  $\mu\text{g/ml}$  LTA i njihovim kombinacijama s 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 da bi se ispitalo moduliraju li ove koncentracije rhHsp70 odgovor na LPS i LTA, iako same nužno ne potiču upalni odgovor (individualna tretiranja s rhHsp70 pokazala su da 1  $\mu\text{g/ml}$  uglavnom ne potiče, dok 3  $\mu\text{g/ml}$  uglavnom potiče izlučivanje citokina). Prema rezultatima dobivenim uz primjenu samog rhHsp70 određivani su samo citokini IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u mediju iznad stanica, a koncentracije citokina su izražene u pg/ml.

LPS i LTA snažno su potaknuli lučenje svih određivanih citokina (slika 4.2.7.), no niti u jednom slučaju koncentracije citokina izlučene nakon tretiranja kombinacijama rhHsp70 i LPS-a ili LTA nisu se značajno razlikovale od onih izlučenih nakon tretiranja samo LPS-om ili s LTA. Ipak, izračunate interakcije između LPS-a i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 bile su antagonističkog tipa (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.2.7.** Grafički prikaz lučenja IL-6 (a), IL-8 (b) i TNF- $\alpha$  (c) iz monocita nakon individualnih tretiranja LPS-om ili s LTA tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=6$ ). NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### **4.2.4. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja LPS-a i LTA u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava**

Citotoksičnost djelovanja LPS-a, LTA te njihovih kombinacija s rhHsp70 na THP-1 stanicama i monocitima ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTS testom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica te određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama.

##### ***4.2.4.1. Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica monocitno-makrofagnog sustava (MTS test)***

Stanice su tretirane tijekom 24 h s 0,1 µg/ml LPS-a, 1 µg/ml LTA te njihovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (THP-1 stanice), odnosno s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (monociti).

LPS je uzrokovao značajan citotoksični učinak u **THP-1** stanicama, za razliku od LTA koji nije imao značajan utjecaj na vijabilnost. Usporedbom kombiniranih tretiranja LPS-a ili LTA s rhHsp70 i individualnih tretiranja samim LPS-om ili LTA nisu pronađene značajne razlike u vijabilnosti THP-1 stanica te nisu računski dobivene značajne interakcije.

Jedino je kombinacija LTA i 3 µg/ml rhHsp70 imala citotoksični učinak na **monocite**.

##### ***4.2.4.2. Utjecaj LPS-a, LTA i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica monocitno-makrofagnog sustava***

THP-1 stanice i monociti tretirani su s 0,1 µg/ml LPS-a, 1 µg/ml LTA i njihovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (THP-1 stanice) te 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (monociti) tijekom 24 h.

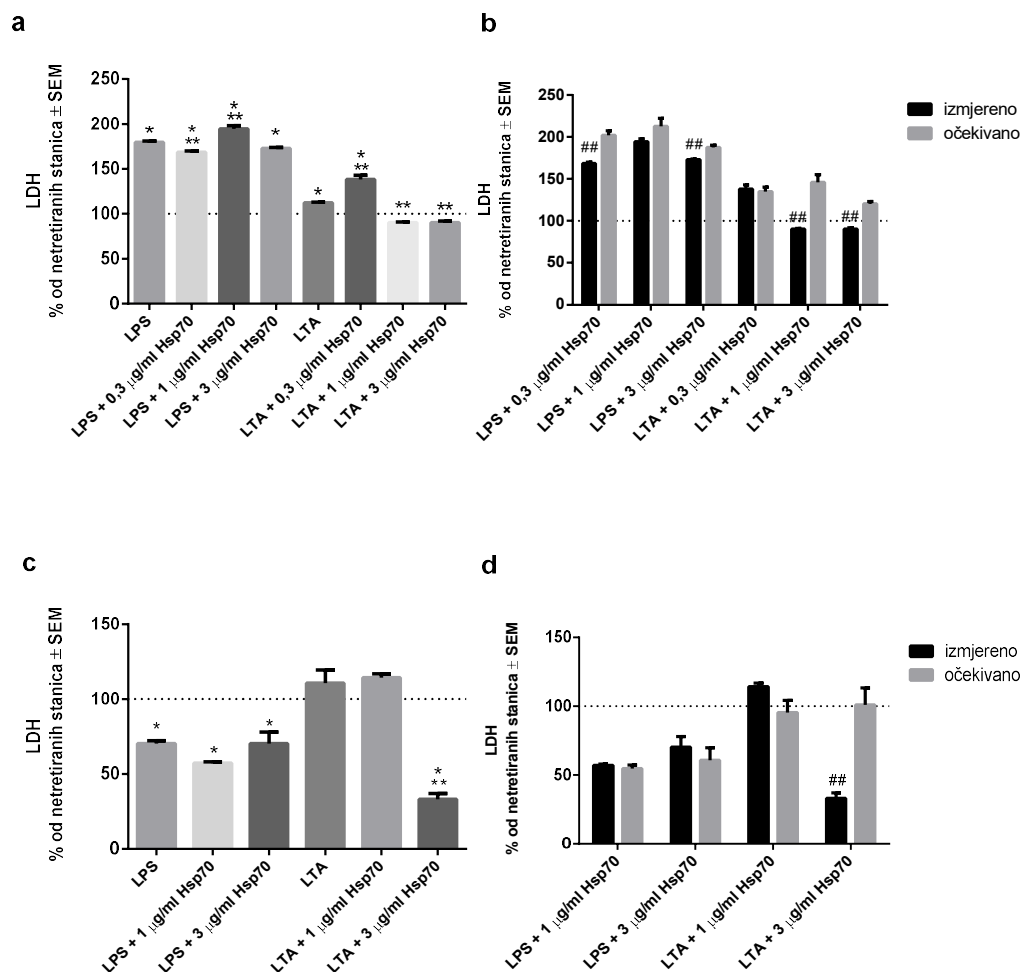
##### **THP-1 stanice:**

**LPS i njegove kombinacije** s rhHsp70 u svim ispitivanim koncentracijama značajno povećavaju lučenje LDH u odnosu na netretirane stanice, ali je ono značajno niže za kombinaciju s 0,3, tj. značajno više za kombinaciju s 1 µg/ml rhHsp70 u odnosu na stanice tretirane samo LPS-om. Ipak, izračunate interakcije su antagonističkog tipa za kombinacije LPS-a i 0,3 i 3 µg/ml rhHsp70.

**LTA i njegove kombinacije** s 0,3 µg/ml rhHsp70 potiče značajno više izlučivanje LDH u odnosu na netretirane stanice, dok je aktivnost LDH nakon tretiranja svim ispitivanim kombinacijama LTA i rhHsp70 bila značajno različita od one izlučene u medij nakon tretiranja samo s LTA. Izračunate interakcije su bile antagonističkog tipa za kombinacije s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (slika 4.2.8. a, b).

## Monociti:

**LPS i njegove kombinacije** s 1 ili 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 potiskuju izlučivanje LDH u odnosu na netretirane stanice, a slični rezultati dobiveni su i nakon tretiranja monocita kombinacijom LTA i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70. Ova posljednja kombinacija imala je značajno različitu katalitičku aktivnost LDH u odnosu na stanice tretirane samim LTA te je ova interakcija bila antagonističkog tipa (slika 4.2.8. c, d).



**Slika 4.2.8.** Grafički prikaz utjecaja LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad THP-1 stanica (a, b) i monocita (c, d). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=6$ ).

(a, c) Katalitička aktivnost LDH u mediju iznad THP-1 stanica (a) i monocita (c) tretiranih LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na LPS ili LTA

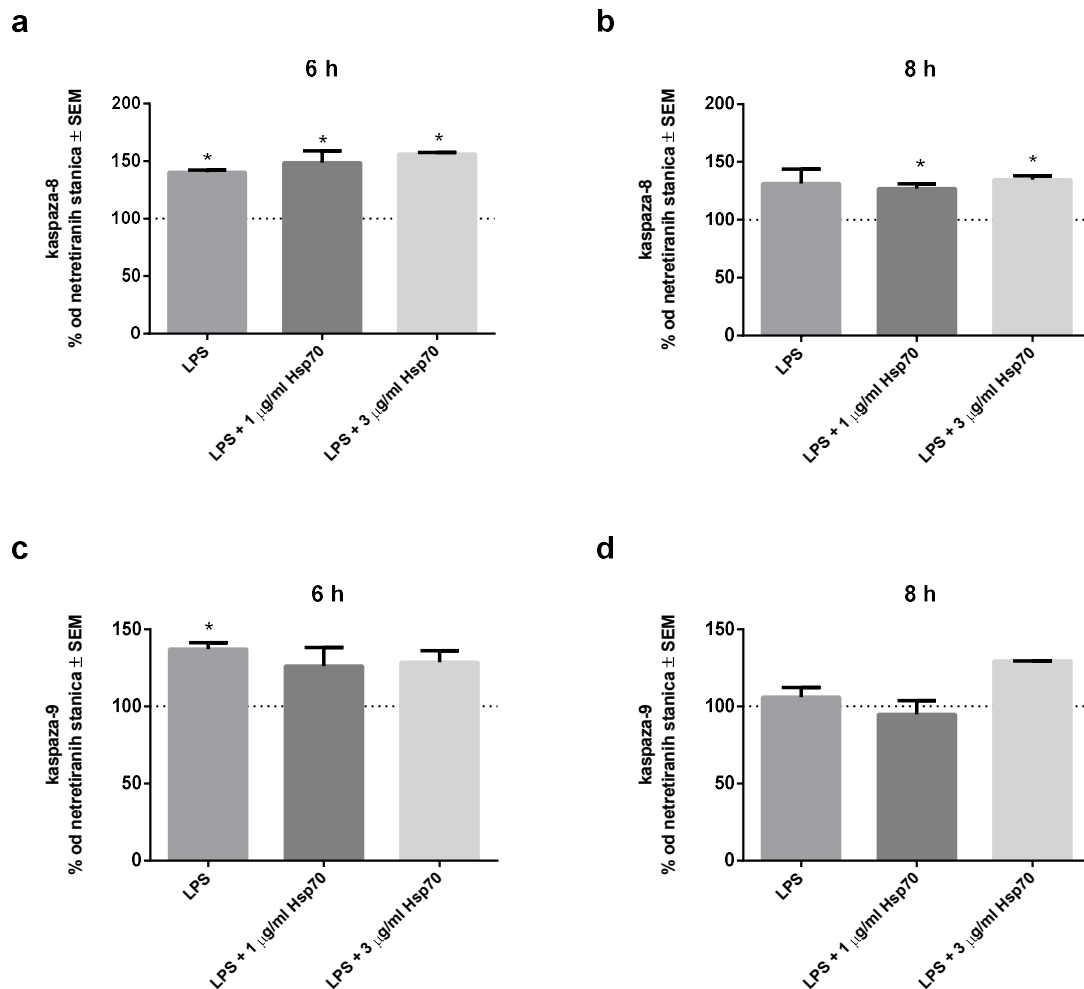
(b, d) Utjecaj interakcija LPS-a ili LTA s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad THP-1 stanica (b) i monocita (d). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P<0,05$ ) antagonistički učinak

#### ***4.2.4.3. Utjecaj LPS-a, LTA i njihovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica monocitno-makrofagnog sustava***

##### **THP-1 stanice:**

Stanice su tretirane s 0,1 µg/ml LPS-a, 1 µg/ml LTA te kombinacijama LPS-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 tijekom 6 i 8 h. Ovi uvjeti izabrani su na temelju prethodnih istraživanja. LTA nije aktivirao niti jednu od ispitivanih kaspaza. S druge strane, sam LPS i njegove kombinacije s rhHsp70 nisu značajno aktivirali **kaspaze-3/7**. Ipak, **kaspaza-8** značajno je aktivirana nakon 6 h tretiranja LPS-om te njegovim kombinacijama s 1 i 3 µg/ml rhHsp70, no računski dobivene interakcije između LPS-a i rhHsp70 nisu bile značajne. Kombinacije LPS-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 značajno su aktivirale kaspazu-8 i nakon 8 h, ali njihove interakcije također nisu bile značajne. Individualno tretiranje THP-1 stanica LPS-om tijekom 6 h značajno je aktiviralo i **kaspazu-9**, no kombinacije s rhHsp70 nisu imale jednako djelovanje (slika 4.2.9.). Računski dobivene interakcije LPS-a i 3 µg/ml rhHsp70 na aktivnost kaspaze-9 bile su antagonističkog tipa (podaci nisu prikazani).



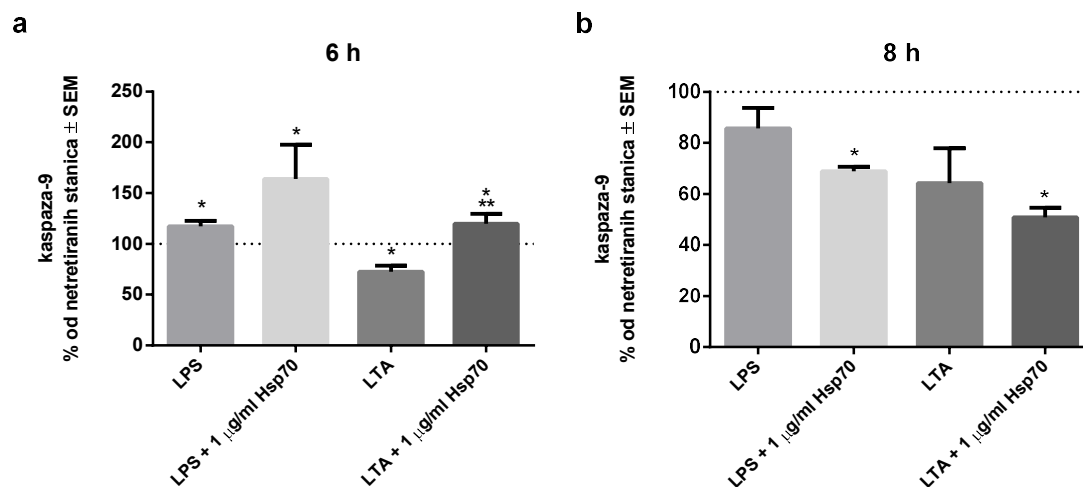
**Slika 4.2.9.** Aktivnost kaspaze-8 (a, b) i kaspaze-9 (c, d) u THP-1 stanicama tretiranim LPS-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 6 i 8 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

### Monociti:

Stanice su tretirane s 0,1 µg/ml LPS-a, 1 µg/ml LTA te njihovim kombinacijama s 1 µg/ml rhHsp70 tijekom 6 i 8 h. LPS je značajno aktivirao **kaspaze-3/7** nakon 6 h, dok LTA nije imao značajnog utjecaja na aktivnost ovih kaspaza, kao ni kombinacije LPS-a ili LTA s rhHsp70. **Kaspaza-8** nije značajno aktivirana ni pod jednim ispitivanim uvjetom (podaci nisu prikazani). LPS aktivira **kaspazu-9** nakon tretiranja tijekom 6 h, kao i kombinacija LPS-a i rhHsp70. S druge strane, LTA smanjuje aktivnost kaspaze-9 nakon 6 h, no kombinacija LTA i rhHsp70 je povećava u odnosu na netretirane stanice i značajno se razlikuje od aktivnosti kaspaze-9 u stanicama tretiranim samo s LTA te su njihove interakcije sinergističkog tipa.

Kombinacije LPS-a ili LTA s rhHsp70 značajno smanjuju aktivnost kaspaze-9 nakon 8 h tretiranja (slika 4.2.10.).



**Slika 4.2.10.** Aktivnost kaspaze-9 u monocitima tretiranim LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 6 h (a) i 8 h (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na LTA

#### **4.2.5. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava**

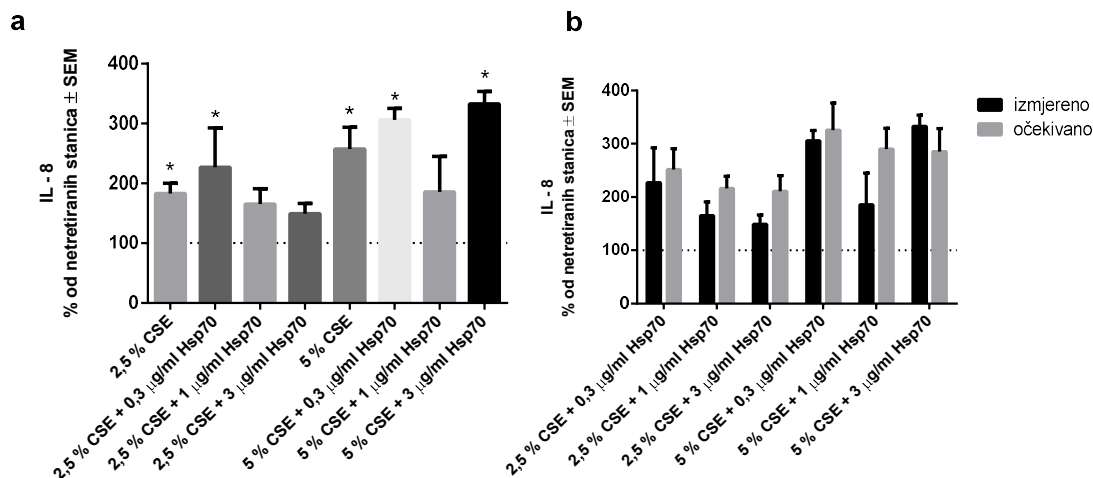
##### ***4.2.5.1. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na THP-1 staničnoj liniji***

Na temelju prethodnih istraživanja u kojima su ispitana djelovanja različitih koncentracija CSE-a (2,5, 5, 10, 15 i 20 %), odabrane su dvije koncentracije CSE-a za tretiranje stanica u daljnjim ispitivanjima, 2,5 i 5 %. Stanice su istodobno tretirane kombinacijama CSE-a s rhHsp70.

Tretiranje samo s 2,5 % CSE-a i 5 % CSE-a potaknulo je značajno lučenje **IL-8**, dok lučenje IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  nije inducirano. Stoga su za kombinirana tretiranja s CSE-om i rhHsp70 određivane samo koncentracije IL-8.

**Kombinacije 2,5 % CSE-a** i 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 potiču značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice, ali se koncentracija IL-8 u kombiniranim tretiranjima nije značajno razlikovala od one kod tretiranja samo CSE-om te nije bilo značajnih izračunatih interakcija.

**Kombinacije 5 % CSE-a** i 0,3 ili 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 potiču značajno lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice, no koncentracije izlučenog IL-8 ne razlikuju se značajno od onih izlučenih nakon tretiranja samim CSE-om te nema značajnih izračunatih interakcija (slika 4.2.11.).



**Slika 4.2.11.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-8 iz THP-1 stanica tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a) Lučenje IL-8 nakon tretiranja stanica tijekom 24 h samim CSE-om i kombinacijom CSE-a i rhHsp70.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

(b) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-8. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

#### 4.2.5.2. Ispitivanje upalnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na primarnim monocitima

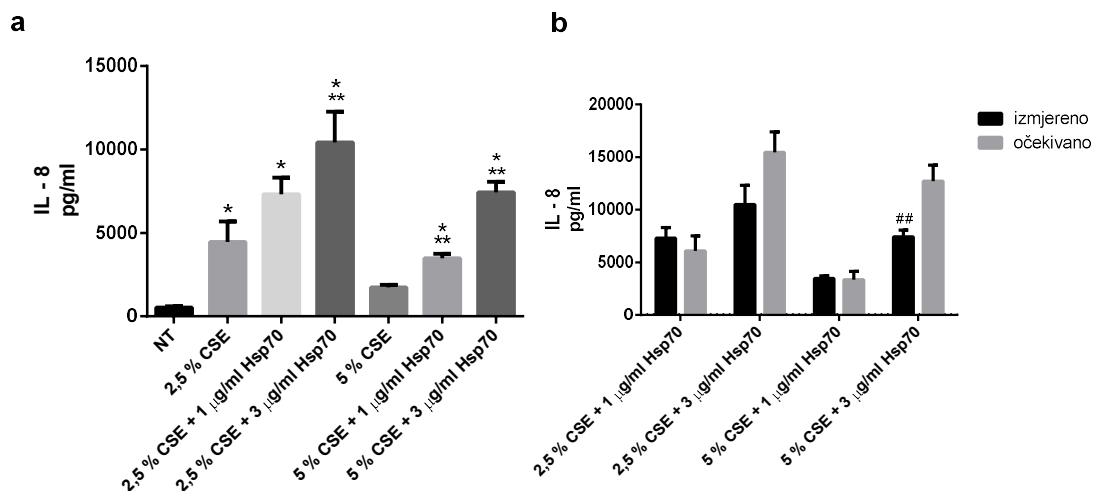
Monociti su tretirani s 2,5 i 5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s 1 i 3 µg/ml rhHsp70. Prema rezultatima iz prethodnih istraživanja gdje su određivane koncentracije IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α u monocitima tretiranim s 2,5-20 % CSE-a, stimulirano je lučenje samo IL-8 te su u daljnjim ispitivanjima određivane samo koncentracije **IL-8** u mediju iznad stanica. Koncentracije citokina su izražene u pg/ml.

**2,5 % CSE sam i u kombinaciji** s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 snažno je potaknuo lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice, a koncentracija IL-8 izlučenog nakon tretiranja s 2,5 % CSE-a i 3 µg/ml rhHsp70 značajno je viša u odnosu na IL-8 izlučen nakon tretiranja monocita samo s 2,5 % CSE-a. Ipak, izračunate interakcije nisu značajne.

**5 % CSE u kombinaciji** s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 snažno je potaknuo lučenje IL-8 u odnosu na netretirane stanice, za razliku od samog 5 % CSE-a. Ove koncentracije također se značajno



razlikuju od IL-8 izlučenog nakon tretiranja monocita samim 5 % CSE-om. Izračunate interakcije između 5 % CSE-a i 3 µg/ml rhHsp70 bile su antagonističkog tipa (slika 4.2.12.).



**Slika 4.2.12.** Grafički prikaz utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-8 iz monocita tretiranih tijekom 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

(a) Lučenje IL-8 nakon tretiranja stanica tijekom 24 h samim CSE-om i kombinacijom CSE-a i rhHsp70. NT = netretirane stanice.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(b) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na lučenje IL-8. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

#### **4.2.6. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava**

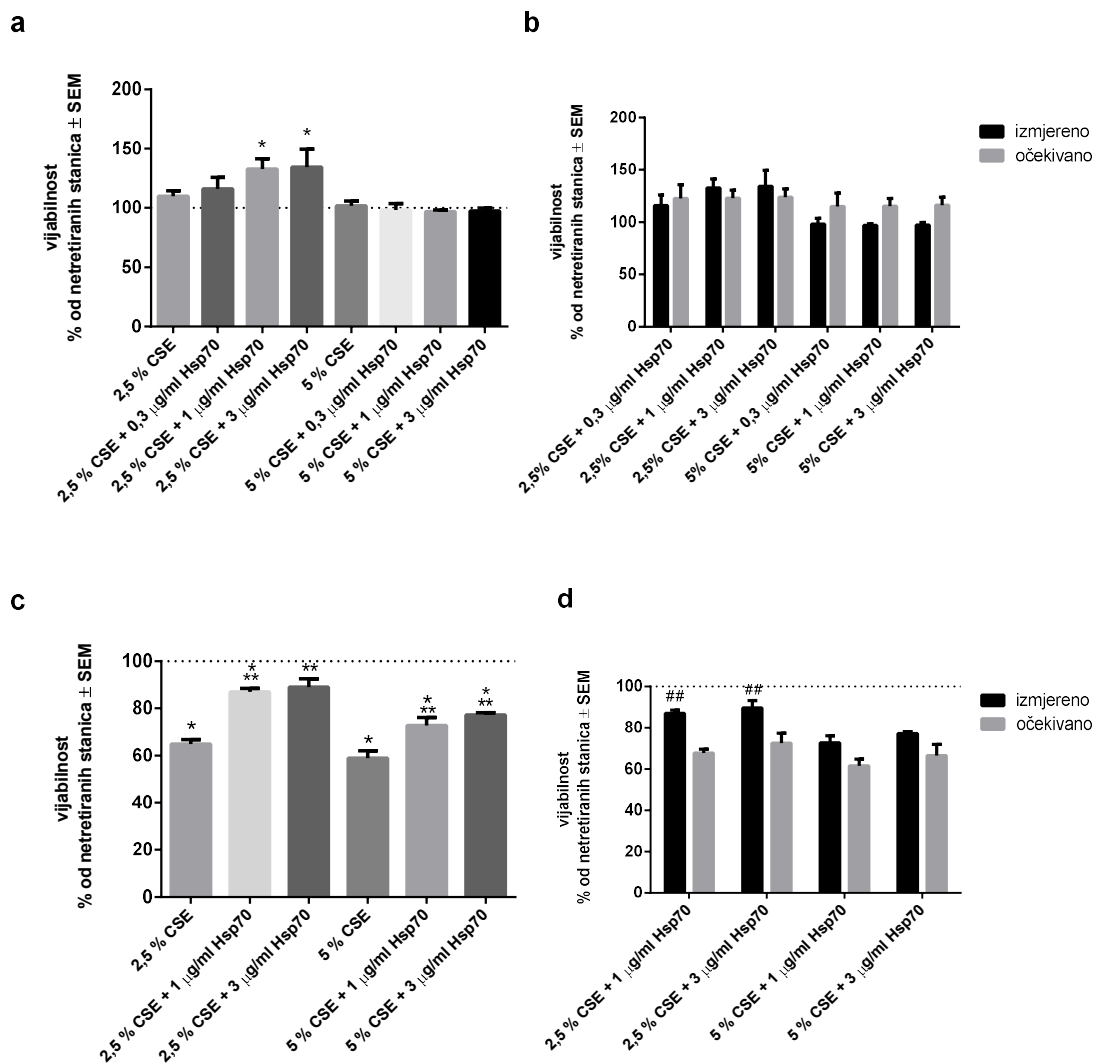
Citotoksičnost djelovanja CSE-a te njegovih kombinacija s rhHsp70 na THP-1 stanicama i monocitima ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTS testom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica te određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama.

##### ***4.2.6.1. Utjecaj CSE-a i kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost stanica monocitno-makrofagnog sustava (MTS test)***

Stanice su tretirane tijekom 24 h s 2,5 i 5 % CSE-a te njegovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (THP-1 stanice), odnosno s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (monociti).

Sam CSE nije uzrokovao značajan citotoksični učinak u **THP-1** stanicama, a kombinacije 2,5 % CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 čak su i povećale vijabilnost THP-1 stanica u odnosu na netretirane stanice. Ipak, nije bilo značajne razlike u vijabilnosti nakon tretiranja THP-1 stanica samim CSE-om ili kombinacijama CSE-a i rhHsp70, kao ni značajnih izračunatih interakcija (slika 4.2.13. a, b).

Za razliku od THP-1 stanica, 2,5 % i 5 % CSE uzrokovao je značajan citotoksični učinak na **monocyte**. Sve ispitivane **kombinacije CSE-a** s rhHsp70 povećavaju vijabilnost stanica u odnosu na sam CSE. Ipak, vijabilnost uz kombinirana tretiranja je značajno niža u odnosu na netretirane stanice, osim za kombinaciju 2,5 % CSE-a i 3 µg/ml rhHsp70. Izračunate interakcije između 2,5 % CSE-a i rhHsp70 antagonističkog su tipa (slika 4.2.13.c, d).



**Slika 4.2.13.** Grafički prikaz utjecaja CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost THP-1 stanica (a,b) i monocita (c, d). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, b) Vijabilnost THP-1 stanica (a) i monocita (c) tretiranih CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h određena MTS testom.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(c, d) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na vijabilnost THP-1 stanica (b) i monocita (d). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

#### **4.2.6.2. Utjecaj CSE i kombinacija s rhHsp70 na otpuštanje LDH u medij iznad stanica monocitno-makrofagnog sustava**

THP-1 stanice i monociti tretirani su 2,5 i 5 % CSE-om i njegovim kombinacijama s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (THP-1 stanice), odnosno s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (monociti) tijekom 24 h.

##### **THP-1 stanice:**

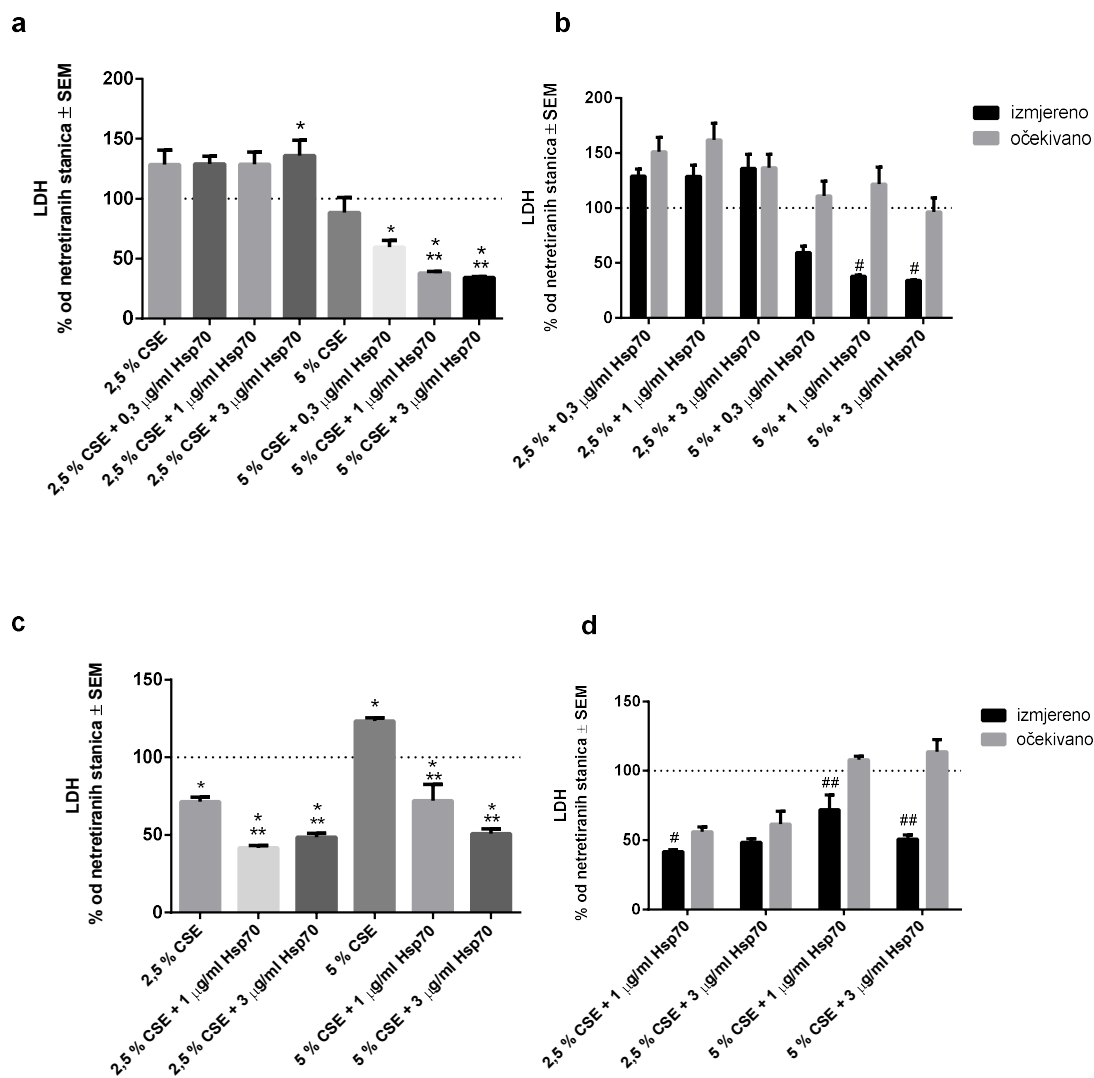
Individualna tretiranja **CSE-om** ne dovode do značajnog otpuštanja LDH u medij iznad THP-1 stanica u odnosu na netretirane stanice.

**Kombinacija 2,5 % CSE-a** i 3 µg/ml rhHsp70 značajno povećava lučenje LDH u odnosu na netretirane stanice, ali se ono ne razlikuje od LDH izlučene nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om te nema značajnih izračunatih interakcija.

**Kombinacija 5 % CSE-a** s 0,3, 1 i 3 µg/ml rhHsp70 potiskuje izlučivanje LDH u odnosu na netretirane stanice, a za kombinacije 5 % CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 ono je i značajno niže u odnosu na LDH izlučenu nakon tretiranja stanica samim 5 % CSE-om. Izračunate interakcije su sinergističkog tipa za lučenja LDH za kombinacije CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 (slika 4.2.14. a, b).

##### **Monociti:**

**2,5 % CSE sam i u kombinaciji** s 1 ili 3 µg/ml rhHsp70 potiskuje izlučivanje LDH u odnosu na netretirane stanice, a kombinirana tretiranja i u odnosu na sam 2,5 % CSE. Slični rezultati dobiveni su i nakon tretiranja monocita **kombinacijom 5 % CSE-a** i 1 i 3 µg/ml rhHsp70 u odnosu na netretirane stanice te u odnosu na sam 5 % CSE. Suprotno tome, sam 5 % CSE uzrokuje značajno otpuštanje LDH. Izračunate interakcije između 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 sinergističkog su tipa, dok su interakcije između 5 % CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 antagonističkog tipa (slika 4.2.14. c, d).



**Slika 4.2.14.** Grafički prikaz utjecaja CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad THP-1 stanica (a, b) i monocita (c, d). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=4).

(a, c) Katalitička aktivnost LDH u mediju iznad THP-1 stanica (a) i monocita (c) tretiranih CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(b, d) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad THP-1 stanica (b) i monocita (d). Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

# statistički značajan ( $P < 0,05$ ) sinergistički učinak

## statistički značajan ( $P < 0,05$ ) antagonistički učinak

#### 4.2.6.3. Utjecaj CSE i njegovih kombinacija s rhHsp70 na način umiranja stanica monocitno-makrofagnog sustava

##### THP-1 stanice:

Stanice su tretirane s 2,5 i 5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 tijekom 6 i 8 h.

**Kaspaze-3/7** nisu značajno aktivirane ni pod jednim ispitanim uvjetom (podaci nisu prikazani).

2,5 % CSE dovodi do značajne aktivacije **kaspaze-8** nakon 6 h, dok u istom vremenu tretiranja 5 % CSE dovodi do sniženja aktivnosti kaspaze-8. **Kombinacije 2,5 % CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70** dovode do značajne aktivacije kaspaze-8 nakon tretiranja THP-1 stanica tijekom 6 h i 8 h u odnosu na netretirane stanice, no aktivnost kaspaze-8 ne razlikuje se od one dobivene nakon tretiranja stanica samim 2,5 % CSE-om te nema značajnih izračunatih interakcija. **Kombinacije 5 % CSE-a i rhHsp70** ne uzrokuju značajnu aktivaciju kaspaze-8.

2,5 % CSE dovodi do značajne aktivacije **kaspaze-9** nakon 6 i 8 h. **Kombinacije 2,5 % CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70** značajno su aktivirale kaspazu-9 nakon 6 h, no aktivnost kaspaze-9 nije se razlikovala od aktivnosti dobivene nakon tretiranja stanica samo s 2,5 % CSE-a tijekom 6 h te izračunate interakcije nisu bile značajne. Ostali ispitani uvjeti nisu doveli do značajnih promjena u aktivnosti kaspaze-9 u odnosu na netretirane stanice ili na stanice tretirane samim CSE-om (tablica 4.2.1.).

**Tablica 4.2.1.** Aktivnost kaspaze-8 i -9 u THP-1 stanicama tretiranim CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70

	KASPAZA-8		KASPAZA-9	
	6 h	8 h	6 h	8 h
<b>2,5 % CSE</b>	<b>181,40 ± 7,29*</b>	129,60 ± 31,93	<b>149,40 ± 7,63*</b>	<b>124,80 ± 2,20*</b>
+ 1 µg/ml rhHsp70	<b>173,20 ± 19,28*</b>	<b>175,30 ± 20,80*</b>	<b>162,90 ± 8,56*</b>	123,40 ± 16,24
+ 3 µg/ml rhHsp70	<b>150,20 ± 2,97*</b>	<b>179,50 ± 0,50*</b>	<b>154,60 ± 8,59*</b>	125,00 ± 11,24
<b>5 % CSE</b>	<b>81,30 ± 1,77*</b>	96,34 ± 4,71	100,30 ± 2,33	91,24 ± 5,17
+ 1 µg/ml rhHsp70	98,90 ± 10,51	104,40 ± 8,09	103,30 ± 5,30	99,11 ± 3,56
+ 3 µg/ml rhHsp70	91,74 ± 0,70	97,08 ± 3,51	106,80 ± 5,32	99,64 ± 10,21

Rezultati su prikazani kao % od aktivnosti kaspaze u netretiranim stanicama.

\* statistički značajno (P<0,05) u odnosu na netretirane stanice

### **Monociti:**

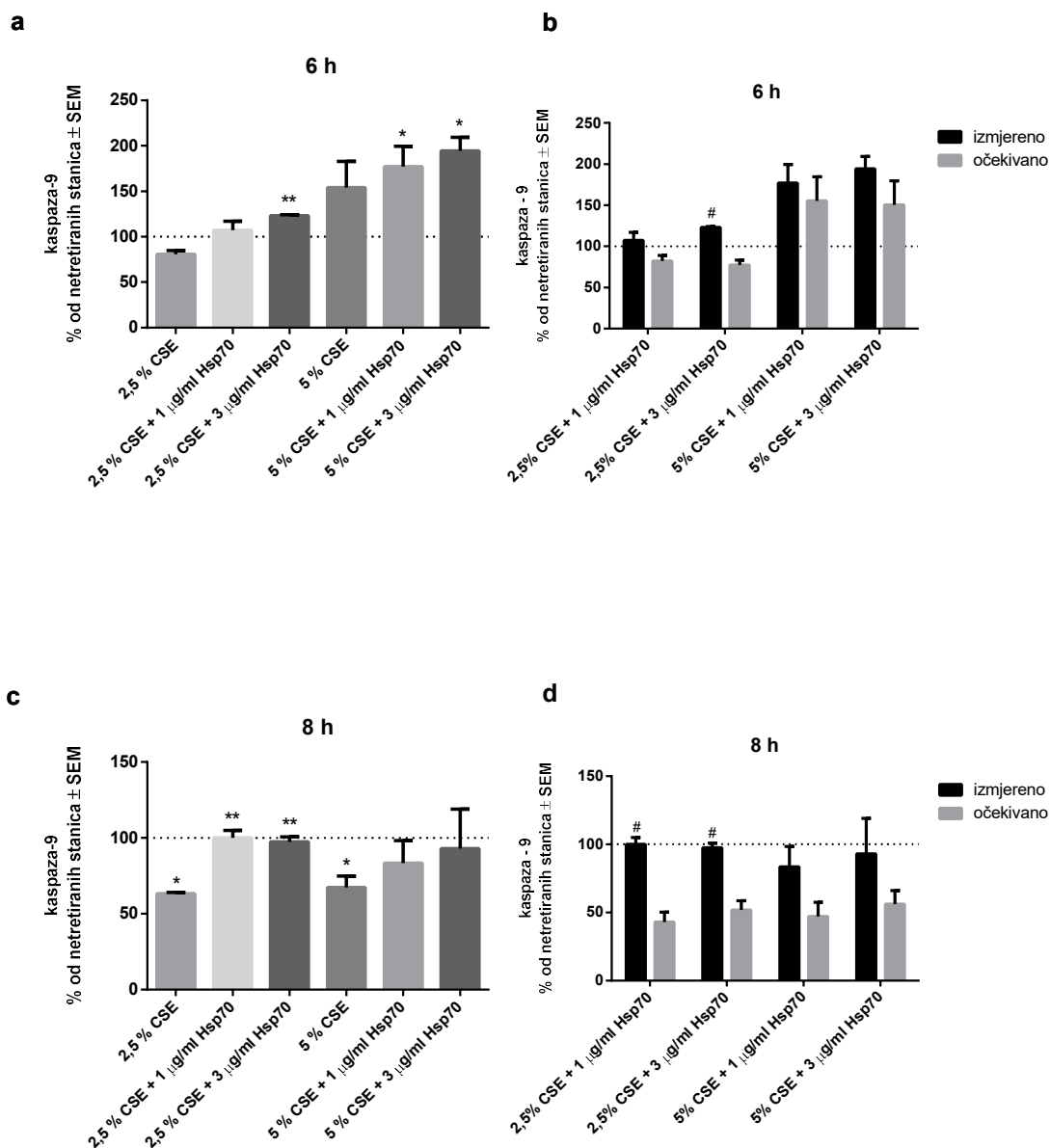
Stanice su tretirane s 2,5 i 5 % CSE-a te njegovim kombinacijama s 1 i 3 µg/ml rhHsp70 tijekom 6 i 8 h.

5 % CSE značajno je aktivirao **kaspaze-3/7** nakon tretiranja monocita tijekom 6 h, kao i kombinacija 5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70. Ova aktivnost nije se razlikovala od aktivnosti kaspaze-3/7 nakon tretiranja monocita samim 5 % CSE-om te nije bilo značajnih izračunatih interakcija. Iako kombinacije 2,5 % CSE-a i rhHsp70 nisu aktivirale kaspaze-3/7 u monocitima, aktivnost kaspaze-3/7 nakon tretiranja kombinacijom 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml značajno je viša od aktivnosti nakon tretiranja samim 2,5 % CSE-om (podaci nisu prikazani).

**Kaspaza-8** nije značajno aktivirana ni pod jednim ispitanim uvjetom (podaci nisu prikazani).

Aktivnost **kaspaze-9** snižena je u monocitima tretiranim s 2,5 i 5 % CSE-a nakon 8 h u odnosu na netretirane monocite.

**Kombinacija 2,5 % CSE-a i rhHsp70** ne uzrokuje značajnu aktivaciju kaspaze-9 nakon 6 h, no aktivnost kaspaze-9 nakon tretiranja monocita kombinacijom 2,5 % CSE-a i 3 µg/ml rhHsp70 značajno je viša u odnosu na aktivnost kaspaze-9 u stanicama tretiranim samim 2,5 % CSE-om te su izračunate interakcije sinergističkog tipa. Nakon tretiranja monocita kombinacijama 2,5 % CSE i rhHsp70 tijekom 8 h ne dolazi do značajne aktivacije kaspaze-9 u odnosu na netretirane stanice, no aktivnost kaspaze-9 razlikuje se u odnosu na aktivnost u monocitima tretiranim samim 2,5 % CSE-om te su izračunate interakcije među njima sinergističkog tipa. **Kombinacija 5 % CSE-a s 1 i 3 µg/ml rhHsp70** uzrokuje značajnu aktivaciju kaspaze-9 u odnosu na netretirane stanice nakon 6 h tretiranja, no aktivnost kaspaze-9 ne razlikuje se od aktivnosti nakon tretiranja samim CSE-om te nema značajnih izračunatih interakcija (slika 4.2.15.).



**Slika 4.2.15.** Utjecaj CSE-a i njegovih kombinacijama s rhHsp70 na aktivnost kaspaze-9 u monocitima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

(a, c) Aktivnost kaspaze-9 u monocitima tretiranim CSE-om i rhHsp70 tijekom 6 (a) i 8 (c) h.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na CSE

(b, d) Utjecaj interakcija CSE-a i rhHsp70 na aktivnost kaspaze-9 u monocitima. Crni stupići predstavljaju izmjerene vrijednosti, a sivi očekivane (izračunate) vrijednosti.

# statistički značajan ( $P < 0,05$ ) sinergistički učinak



### 4.3. ISPITIVANJE MEHANIZAMA DJELOVANJA rhHSP70, LPS-a, LTA I CSE-a NA STANICAMA PLUĆNOG EPITELA I MONOCITNO-MAKROFAGNOG SUSTAVA

Mehanizmi djelovanja rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a istraženi su ispitivanjem ekspresije TLR2, TLR4 i unutarstaničnog Hsp70 te aktivacije MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova.

Ekspresija TLR2, TLR4 i unutarstaničnog Hsp70 ispitana je određivanjem ekspresije mRNA za TLR2, TLR4 i Hsp70 qPCR metodom nakon tretiranja stanica s rhHsp70 ili CSE-om tijekom 24 h. **Stanice plućnog epitela** (NCI-H292, NHBE, PBEC i PBEC KOPB) tretirane su s 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 te 2,5 i 15 % CSE-a, a stanice **monocitno-makrofagnog** sustava (THP-1 i monociti) s 3 i 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 te 2,5 i 5 % CSE-a (n=3).

Ekspresija TLR2, TLR4 i unutarstaničnog Hsp70 također je ispitana Western blot metodom, kao i ekspresija te aktivacija MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova.

**NCI-H292** stanice tretirane su s 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70, 0,1  $\mu$ g/ml LPS-a, 1  $\mu$ g/ml LTA i njihovim kombinacijama, kao i s 2,5 i 15 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 30 minuta, 2 i 8 h te s 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70, 0,1  $\mu$ g/ml LPS-a i 1  $\mu$ g/ml LTA tijekom 24 h. **NHBE** stanice tretirane su s 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70, 0,1  $\mu$ g/ml LPS-a, 1  $\mu$ g/ml LTA te 2,5 i 15 % CSE-a tijekom 30 minuta, 2 i 8 h.

**THP-1** stanice tretirane su s 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70, 0,1  $\mu$ g/ml LPS-a, 1  $\mu$ g/ml LTA i njihovim kombinacijama, kao i s 2,5 i 5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 30 minuta, 2 i 8 h te s 0,3, 1 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70, 0,1  $\mu$ g/ml LPS-a i 1  $\mu$ g/ml LTA tijekom 24 h. **Monociti** su tretirani s 3 i 10  $\mu$ g/ml rhHsp70, 0,1  $\mu$ g/ml LPS-a, 1  $\mu$ g/ml LTA te 2,5 i 5 % CSE-a tijekom 30 minuta, 2 i 8 h.

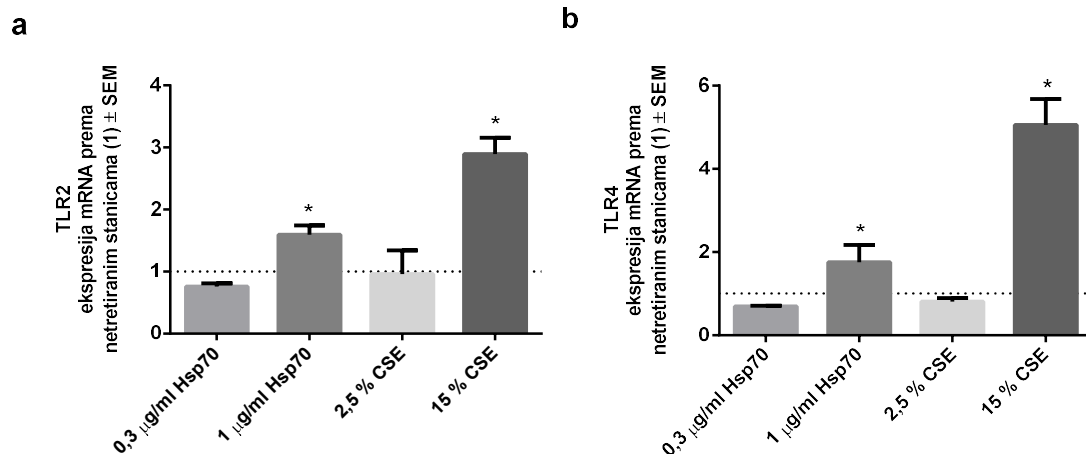
Uloga aktivacije navedenih molekula u upalnom odgovoru ispitana je pod utjecajem inhibitora i opisana je u poglavlju 4.3.5.

#### 4.3.1. Ispitivanje aktivacije TLR2 i TLR4

##### *4.3.1.1. Ispitivanje aktivacije TLR2 i TLR4 receptora na stanicama plućnog epitela*

##### **Ekspresija mRNA za TLR2 i TLR4:**

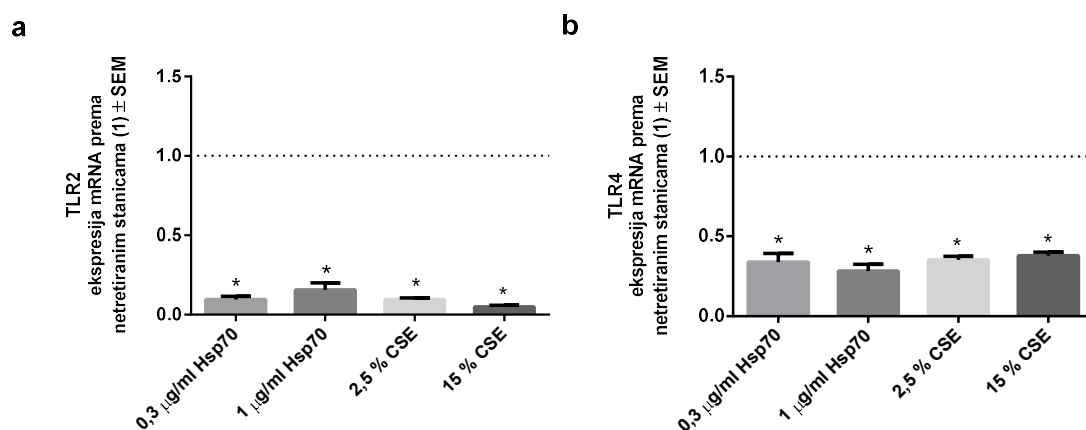
U **NCI-H292** stanicama 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 povećao je ekspresiju mRNA za TLR2 ( $1,59 \pm 0,15$  puta) i za TLR4 ( $1,75 \pm 0,42$  puta). 15 % CSE povećao je ekspresiju mRNA za TLR2 ( $2,89 \pm 0,26$  puta) i ekspresiju mRNA za TLR4 ( $5,05 \pm 0,62$  puta) (slika 4.3.1).



**Slika 4.3.1.** Grafički prikaz ekspresije mRNA za TLR2 (a) i TLR4 (b) u NCI-H292 stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

U **NHBE** i **PBEC** stanicama nije došlo do promjene u ekspresiju mRNA za TLR2 ili TLR4 ni pod jednim ispitivanim uvjetom (podaci nisu prikazani), dok je ekspresija mRNA za TLR2 ( $0,10 \pm 0,01$  za 0,3;  $0,16 \pm 0,04$  za 1 µg/ml rhHsp70;  $0,09 \pm 0,01$  za 2,5 %;  $0,05 \pm 0,01$  za 15 % CSE-a) i TLR4 ( $0,34 \pm 0,05$  za 0,3;  $0,28 \pm 0,04$  za 1 µg/ml rhHsp70;  $0,35 \pm 0,02$  za 2,5 %;  $0,38 \pm 0,02$  za 15 % CSE-a) značajno snižena u **PBEC KOPB** stanicama pod svim ispitivanim uvjetima (slika 4.3.2.).



**Slika 4.3.2.** Grafički prikaz ekspresije mRNA za TLR2 (a) i TLR4 (b) u PBEC stanicama izoliranim iz bolesnika s KOPB-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

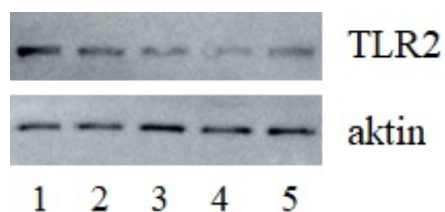
\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

### **Ekspresija TLR2 i TLR4 proteina:**

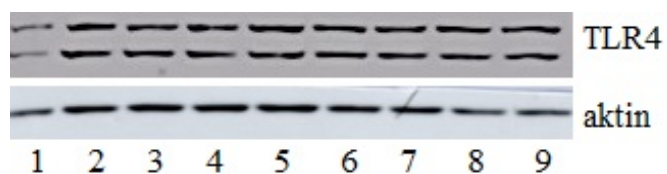
U **NCI-H292** stanicama 2,5 % CSE i njegove kombinacije s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokovali su sniženje ekspresije TLR2 u odnosu na netretirane stanice nakon 30 minuta (slika 4.3.3.), dok u ostalim ispitivanim uvjetima nije došlo do promjena koje bi se mogle detektirati Western blot metodom (podaci nisu prikazani).

Ekspresija TLR4 povišena je u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja NCI-H292 stanica LPS-om, LTA, 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 8 h (slika 4.3.4.).

Ekspresija TLR2 ili TLR4 nije detektirana metodom Western blot pod ispitivanim uvjetima u **NHBE** stanicama (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.3.3.** Western blot analiza ekspresije TLR2 (90-100 kDa) u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s 2,5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 30 minuta. (1) netretirane stanice; (2) 2,5 % CSE; (3) 2,5 % CSE + 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (4) 2,5 % CSE + 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (5) 2,5 % CSE + 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70

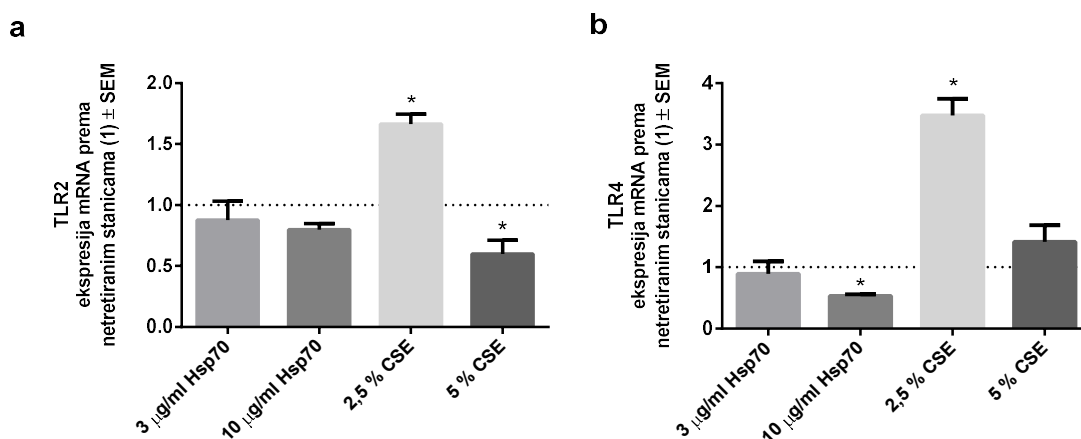


**Slika 4.3.4.** Western blot analiza ekspresije TLR4 (95 kDa i 120 kDa glikozilirani oblik) u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s LPS-om, LTA i rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 8 h. (1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (5) LPS + 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (6) LTA + 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (7) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (8) LPS + 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (9) LTA + 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70

#### 4.3.1.2. Ispitivanje aktivacije TLR2 i TLR4 receptora na stanicama monocitno-makrofagnog sustava

##### Ekspresija mRNA za TLR2 i TLR4:

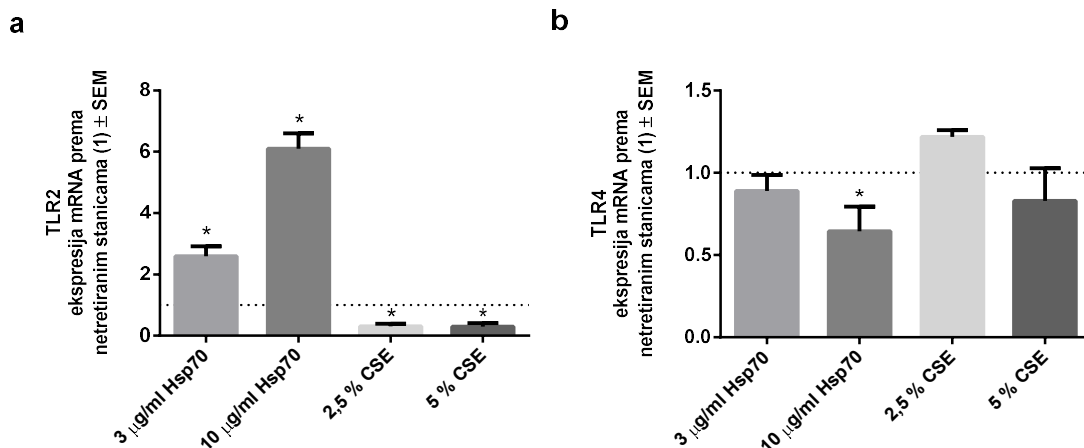
U **THP-1** stanicama 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 snizio je ekspresiju mRNA za TLR4 ( $0,53 \pm 0,03$ ), dok je 2,5 % CSE povećao ekspresiju mRNA za TLR4 ( $3,48 \pm 0,27$  puta). 2,5 % CSE značajno je inducirao ekspresiju mRNA i za TLR2 ( $1,66 \pm 0,08$  puta), dok je 5 % CSE snizio ekspresiju mRNA za TLR2 ( $0,60 \pm 0,11$ ) (slika 4.3.5.).



**Slika 4.3.5.** Grafički prikaz ekspresije mRNA za TLR2 (a) i TLR4 (b) u THP-1 stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=3$ ).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

U **monocitima** su 3 ( $2,59 \pm 0,33$  puta) i 10 ( $6,10 \pm 0,50$  puta)  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 inducirali ekspresiju mRNA za TLR2, dok je istovremeno 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 snizio ekspresiju mRNA za TLR4 ( $0,65 \pm 0,15$ ). CSE je značajno snizio ekspresiju mRNA za TLR2 ( $0,31 \pm 0,08$  za 2,5 % CSE;  $0,30 \pm 0,12$  za 5 % CSE) (slika 4.3.6.).



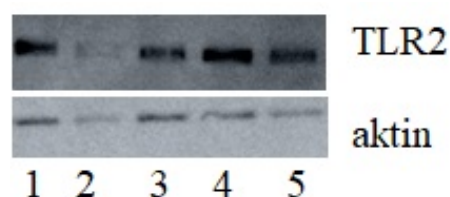
**Slika 4.3.6.** Grafički prikaz ekspresije mRNA za TLR2 (a) i TLR4 (b) u monocitima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### Ekspresija TLR2 i TLR4 proteina:

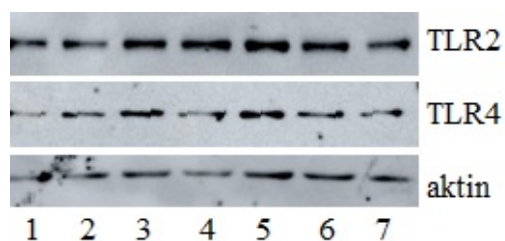
U **THP-1** stanicama 2,5 % CSE uzrokovao je sniženje ekspresije TLR2 nakon 2 h (slika 4.3.7.), dok u ostalim ispitivanim uvjetima nije došlo do promjena koje bi se mogle detektirati Western blot metodom.

U lizatima **monocita** je nakon 30 minuta tretiranja 10 µg/ml rhHsp70, 2,5 i 5 % CSE-om te 0,1 µg/ml LPS-om došlo do povećane ekspresije TLR2, dok je nakon 30 minuta tretiranja 3 i 10 µg/ml rhHsp70, 5 % CSE-om i LPS-om došlo do povećane ekspresije TLR4 u odnosu na netretirane stanice (slika 4.3.8.).



**Slika 4.3.7.** Western blot analiza ekspresije TLR2 (90-100 kDa) u lizatima THP-1 stanica tretiranih s 2,5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 2 h.

(1) netretirane stanice; (2) 2,5 % CSE; (3) 2,5 % CSE + 0,3 µg/ml rhHsp70; (4) 2,5 % CSE + 1 µg/ml rhHsp70; (5) 2,5 % CSE + 3 µg/ml rhHsp70



**Slika 4.3.8.** Western blot analiza ekspresije TLR2 (90-100 kDa) i TLR4 (95 kDa) u lizatima monocita tretiranih rhHsp70, CSE-om, LPS-om i LTA tijekom 30 minuta. (1) netretirane stanice; (2) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (3) 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 5 % CSE; (6) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS; (7) 1  $\mu\text{g/ml}$  LTA

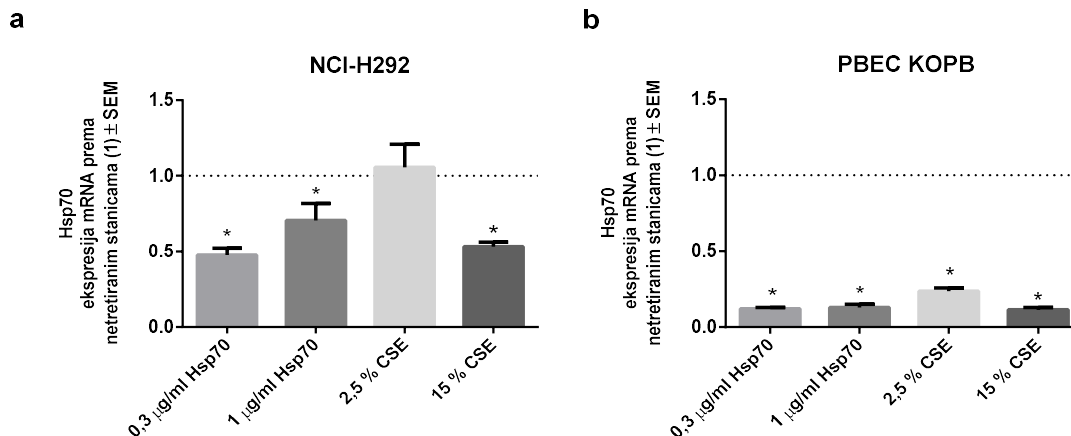
### 4.3.2. Ispitivanje ekspresije unutarstaničnog Hsp70

#### 4.3.2.1. Ispitivanje ekspresije unutarstaničnog Hsp70 na stanicama plućnog epitela

##### **Ekspresija mRNA za Hsp70:**

U **NCI-H292** stanicama 0,3 ( $0,48 \pm 0,05$ ) i 1 ( $0,71 \pm 0,11$ )  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 snizilo je ekspresiju mRNA za Hsp70, kao i 15 % CSE ( $0,53 \pm 0,03$ ) (slika 4.3.9. a).

U **NHBE** i **PBEC** stanicama izoliranim iz zdravih ispitanika nije bilo promjene u ekspresiji mRNA za Hsp70 u ispitivanim uvjetima (podaci nisu prikazani), dok je u **PBEC KOPB** stanicama došlo do značajnog sniženja ekspresije mRNA za Hsp70 u svim ispitanim uvjetima ( $0,12 \pm 0,01$  za 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70;  $0,13 \pm 0,02$  za 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70;  $0,24 \pm 0,02$  za 2,5 % CSE;  $0,12 \pm 0,01$  za 15 % CSE) (slika 4.3.9. b).



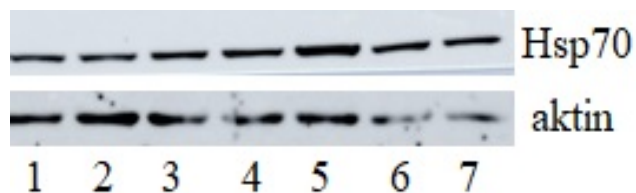
**Slika 4.3.9.** Grafički prikaz ekspresije mRNA za Hsp70 u NCI-H292 (a) i PBEC stanicama izoliranim iz bolesnika s KOPB-om (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (n=3).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

#### Ekspresija unutarstaničnog Hsp70 proteina:

U lizatima **NCI-H292** stanica nije detektirana promjena ekspresije u odnosu na netretirane stanice ni pod jednim ispitivanim uvjetom (podaci nisu prikazani).

U **NHBE** stanicama tretiranim 15 % CSE-om tijekom 8 h došlo je do indukcije ekspresije Hsp70 u odnosu na netretirane stanice (slika 4.3.10.).



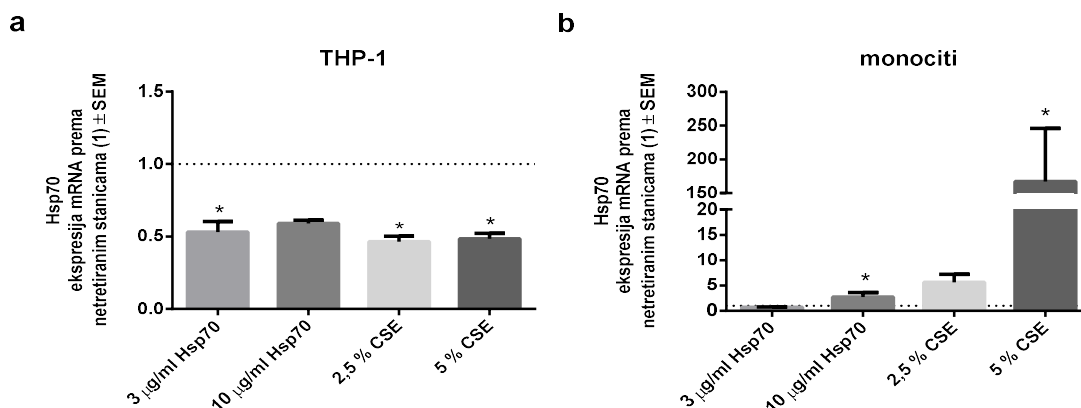
**Slika 4.3.10.** Western blot analiza ekspresije Hsp70 u lizatima NHBE stanica tretiranih s rhHsp70, CSE-om, LPS-om i LTA tijekom 8 h.

(1) netretirane stanice; (2) 0,3 µg/ml rhHsp70; (3) 1 µg/ml rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 15 % CSE; (6) 0,1 µg/ml LPS; (7) 1 µg/ml LTA

#### 4.3.2.2. Ispitivanje ekspresije unutarstaničnog Hsp70 na stanicama monocitno-makrofagnog sustava

##### Ekspresija mRNA za Hsp70:

Ekspresija mRNA za Hsp70 snižena je u THP-1 stanicama nakon tretiranja s 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 ( $0,53 \pm 0,07$ ) te s 2,5 ( $0,46 \pm 0,04$ ) i 5 ( $0,48 \pm 0,04$ ) % CSE-a. U monocitima ekspresija mRNA za Hsp70 značajno je povišena nakon tretiranja 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 ( $2,73 \pm 0,79$ ) i 5 % CSE-om ( $167,20 \pm 78,67$ ) (slika 4.3.11.).



**Slika 4.3.11.** Grafički prikaz ekspresije mRNA za Hsp70 u THP-1 stanicama (a) i monocitima (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $n=3$ ).

\* statistički značajno ( $P<0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

##### Ekspresija Hsp70 proteina:

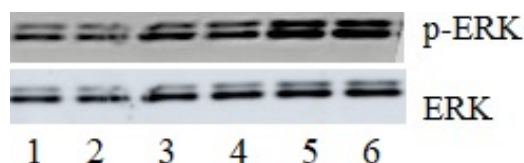
U lizatima **THP-1** stanica i **monocita** nije detektirana promjena ekspresije unutarstaničnog Hsp70 u odnosu na netretirane stanice ni pod jednim ispitivanim uvjetom (podaci nisu prikazani).



### 4.3.3. Ispitivanje aktivacije MAPK

#### 4.3.3.1. Ispitivanje aktivacije MAPK na stanicama plućnog epitela

U NCI-H292 stanicama rhHsp70 u koncentracijama 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  te LPS i LTA značajno su aktivirali ERK u odnosu na netretirane stanice nakon 24 h (slika 4.3.12.).

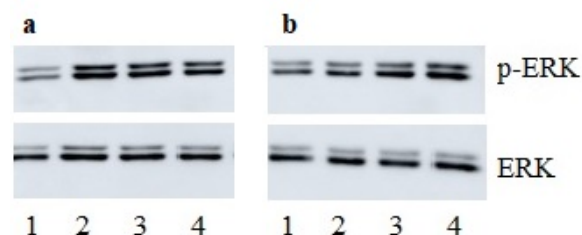


**Slika 4.3.12.** Western blot analiza ekspresije ukupne ERK (44 kDa ERK1 i 42 kDa ERK2) i aktivirane p-ERK u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s rhHsp70, LPS-om i LTA tijekom 24 h.

(1) netretirane stanice; (2) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (3) 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (4) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (5) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS; (6) 1  $\mu\text{g/ml}$  LTA

0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70, LPS i kombinacije LPS-a s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 značajno su aktivirali ERK u odnosu na netretirane stanice nakon 30 min i 8 h (podaci nisu prikazani).

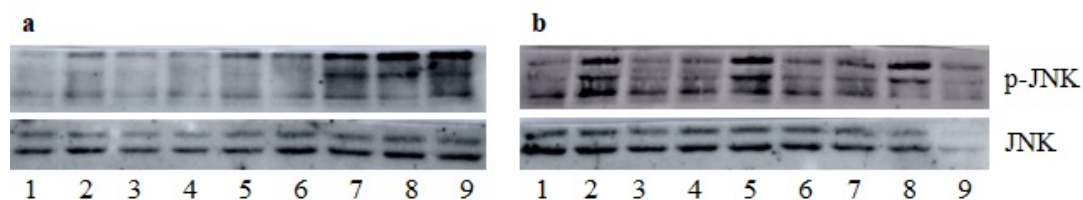
Kombinacija 2,5 % CSE-a i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 značajno je aktivirala ERK u odnosu na netretirane stanice nakon 30 min (podaci nisu prikazani). Sam 15 % CSE značajno je aktivirao ERK u odnosu na netretirane stanice nakon 30 minuta tretiranja, a kombinacije 15 % CSE-a s 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 nakon 30 min i 2 h (slika 4.3.13.).



**Slika 4.3.13.** Western blot analiza ekspresije ukupne ERK (44 kDa ERK1 i 42 kDa ERK2) i aktivirane p-ERK u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s 15 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 30 min (a) i 2 h (b).

(1) netretirane stanice; (2) 15 % CSE; (3) 15 % CSE + 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (4) 15 % CSE + 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70

3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70, kao i njegove kombinacije s LPS-om i LTA, uzrokovali su značajnu aktivaciju **JNK** u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja tijekom 30 minuta, dok je sam LPS te njegove kombinacije s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokovao značajnu aktivaciju JNK u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja tijekom 2 h (slika 4.3.14.). U ostalim ispitivanim uvjetima nije došlo do aktivacije JNK.



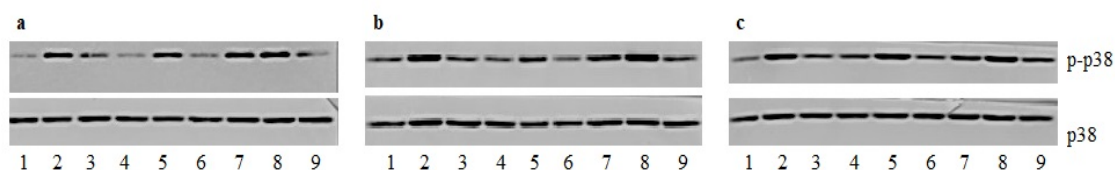
**Slika 4.3.14.** Western blot analiza ekspresije ukupne JNK (46 kDa JNK1 i 55 kDa JNK2) i aktivirane p-JNK (46 kDa JNK1, 55 kDa JNK2 i 32-35 kDa c-Jun kinaza) u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s LPS-om, LTA, rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 30 min (a) i 2 h (b).

(1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (5) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LPS; (6) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LTA; (7) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (8) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LPS; (9) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LTA

3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70, LPS te kombinacije LPS-a s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 inducirali su aktivaciju **p38** nakon 30 minuta, 2 i 8 h u odnosu na netretirane stanice, sam LTA inducirao je značajnu aktivaciju p38 nakon 30 minuta i 8 h, dok su 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 i kombinacija LTA s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 aktivirali p38 u odnosu na netretirane stanice nakon 8 h (slika 4.3.15).

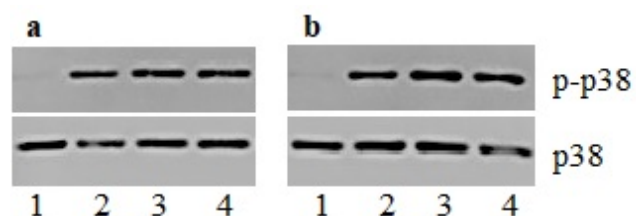
Uz to, kombinacija LPS-a i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 također uzrokuje značajnu aktivaciju p38 u odnosu na netretirane stanice nakon 30 min, 2 i 8 h (podaci nisu prikazani).

15 % CSE i njegove kombinacije s 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokuju aktivaciju p38 nakon 30 min i 2 h (slika 4.3.16.).



**Slika 4.3.15.** Western blot analiza ekspresije ukupne p38 (38 kDa) i aktivirane p-p38 u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s LPS-om, LTA, rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 30 min (a), 2 h (b) i 8 h (c).

(1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (5) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LPS; (6) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LTA; (7) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (8) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LPS; (9) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LTA



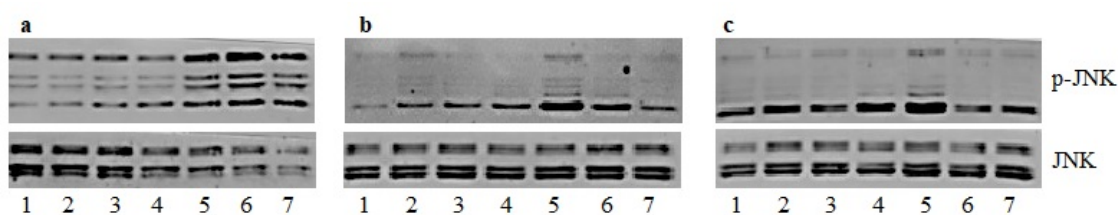
**Slika 4.3.16.** Western blot analiza ekspresije ukupne p38 (38 kDa) i aktivirane p-p38 u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s 15 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 30 min (a) i 2 h (b).

(1) netretirane stanice; (2) 15 % CSE; (3) 15 % CSE + 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (4) 15 % CSE + 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70

U **NHBE** stanicama, 15 % CSE-a uzrokovalo je značajnu aktivaciju **ERK** u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja stanica tijekom 2 i 8 h, dok je LPS uzrokovao značajnu aktivaciju ERK u odnosu na netretirane stanice nakon 2 h (podaci nisu prikazani).

**JNK** je značajno aktivirana s 15 % CSE-om, LPS-om i LTA nakon 30 minuta tretiranja u odnosu na netretirane stanice. Svi ispitani uvjeti uzrokuju pojavu vrpce c-Jun kinaze na oko 32-35 kDa, kod koje se najbolje mogu uočiti promjene u odnosu na netretirane stanice. 1 µg/ml rhHsp70, 2,5 i 15 % CSE, LPS i LTA uzrokuju značajnu aktivaciju ove 32-35 kDa c-Jun kinaze u odnosu na netretirane stanice nakon 30 minuta, dok još i 0,3 µg/ml rhHsp70 uzrokuje isto nakon 2 h. 2,5 i 15 % CSE uzrokuju značajnu aktivaciju 32-35 kDa c-Jun kinaze u odnosu na netretirane stanice nakon 8 h tretiranja (slika 4.3.17.).

15 % CSE uzrokovao je aktivaciju **p38** nakon 2 i 8 h (podaci nisu prikazani).



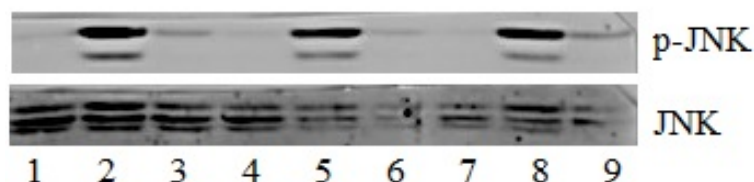
**Slika 4.3.17.** Western blot analiza ekspresije ukupne JNK (46 kDa JNK1, 55 kDa JNK2) i aktivirane p-JNK (46 kDa JNK1, 55 kDa JNK2, 32-35 kDa c-Jun kinaza) u lizatima NHBE stanica tretiranih s rhHsp70, CSE-om, LPS-om i LTA tijekom 30 minuta (a), 2 h (b) i 8 h (c). (1) netretirane stanice; (2) 0,3 µg/ml rhHsp70; (3) 1 µg/ml rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 15 % CSE; (6) 0,1 µg/ml LPS; (7) 1 µg/ml LTA

#### 4.3.3.2. Ispitivanje aktivacije MAPK na stanicama monocitno-makrofagnog sustava

U **THP-1** stanicama, LPS te njegova kombinacija s 0,3, 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 inducirali su značajnu aktivaciju **ERK** u odnosu na netretirane stanice nakon 8 h (podaci nisu prikazani).

U ostalim ispitivanim uvjetima ne dolazi do značajnije aktivacije ERK.

LPS te njegove kombinacije s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokovali su aktivaciju **JNK** nakon 30 minuta, 2 i 8 h (prikazani su samo podaci za 2 h, slika 4.3.18.). LPS s 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 također je aktivirao JNK. U ostalim ispitivanim uvjetima nije došlo do značajne aktivacije JNK.



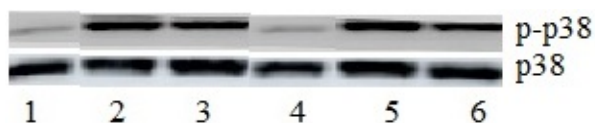
**Slika 4.3.18.** Western blot analiza ekspresije ukupne JNK (46 kDa JNK1, 55 kDa JNK2) i aktivirane p-JNK u lizatima THP-1 stanica tretiranih s LPS-om, LTA, rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 2 h.

(1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (5) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LPS; (6) 0,3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LTA; (7) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (8) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LPS; (9) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 + LTA

**p38** značajno je aktivirana u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja LPS-om i LTA te njihovim kombinacijama s 1  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 tijekom 30 minuta, 2 i 8 h (podaci su prikazani za 30 min, slika 4.3.19.).

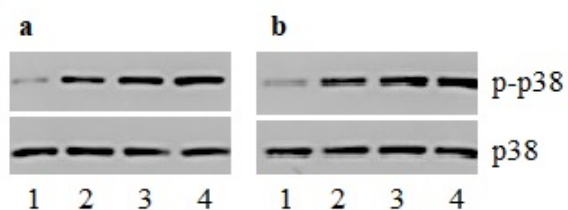
Kombinacije LPS-a s 0,3 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 također uzrokuju značajnu aktivaciju p38 u odnosu na netretirane stanice tijekom 30 minuta, 2 i 8 h (podaci nisu prikazani).

5 % CSE-a te njegove kombinacije s 1 i 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70 uzrokuju značajnu aktivaciju p38 u odnosu na netretirane stanice nakon 30 min, 2 i 8 h (podaci su prikazani za 2 i 8 h, slika 4.3.20.).



**Slika 4.3.19.** Western blot analiza ekspresije ukupne p38 (38 kDa) i aktivirane p-p38 u lizatima THP-1 stanica tretiranih LPS-om, LTA, rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 30 min.

(1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 1  $\mu$ g/ml rhHsp70; (5) 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LPS; (6) 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LTA



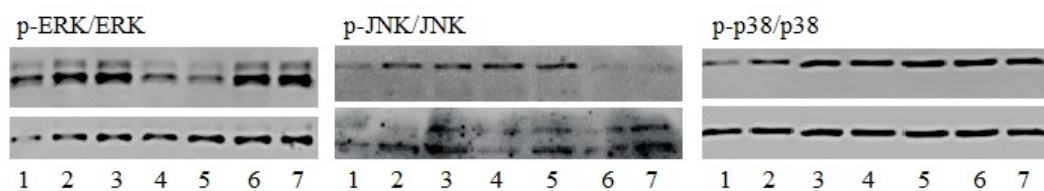
**Slika 4.3.20.** Western blot analiza ekspresije ukupne p38 (38 kDa) i aktivirane p-p38 u lizatima THP-1 stanica tretiranih s 5 % CSE-a i njegovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 2 i 8 h.

(1) netretirane stanice; (2) 5 % CSE; (3) 5 % CSE + 1  $\mu$ g/ml rhHsp70; (4) 5 % CSE + 3  $\mu$ g/ml rhHsp70

U lizatima **monocita**, 3 i 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 uzrokovali su značajnu aktivaciju **ERK** u odnosu na netretirane stanice nakon tretiranja tijekom 8 h. LPS je značajno aktivirao ERK u sve tri ispitane vremenske točke, dok je LTA uzrokovala aktivaciju ERK nakon 2 i 8 h.

3  $\mu$ g/ml rhHsp70 uzrokovao je značajnu aktivaciju **JNK** u odnosu na netretirane stanice nakon 30 min (JNK1 i JNK 2), 2 i 8 h (JNK2), dok je 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 aktivirao JNK2 samo nakon 8 h tretiranja monocita. LPS je uzrokovao značajnu aktivaciju JNK1 i JNK2 nakon 30 min i 2 h, a LTA samo nakon 2 h, dok su 2,5 i 5 % CSE-a aktivirali JNK2 nakon tretiranja stanica tijekom 2 i 8 h.

Do značajne aktivacije **p38** u odnosu na netretirane stanice došlo je pod svim ispitivanim uvjetima osim s 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 nakon tretiranja monocita 30 min i 2 h, dok je nakon 8 h i 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 uzrokovalo aktivaciju p38 (podaci su prikazani samo za 8 h, slika 4.3.21.).



**Slika 4.3.21.** Western blot analiza ekspresije (donja polovica slike) i aktivacije (gornja polovica slike) MAPK u lizatima monocita tretiranih s rhHsp70, CSE-om, LPS-om i LTA tijekom 8 h.

(1) netretirane stanice; (2) 3  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (3) 10  $\mu\text{g/ml}$  rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 5 % CSE; (6) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS; (7) 1  $\mu\text{g/ml}$  LTA

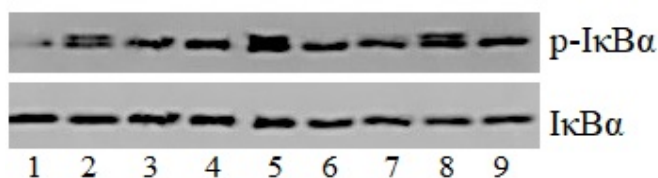
#### 4.3.4. Ispitivanje aktivacije NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B nalazi se neaktivan u citosolu stanica vezan za inhibicijski protein I $\kappa$ B. Aktivacija NF- $\kappa$ B odvija se fosforilacijom I $\kappa$ B $\alpha$  na Ser32 i Ser36 nakon koje slijedi njegova degradacija posredovana proteasomom što rezultira otpuštanjem NF- $\kappa$ B i njegovom translokacijom u jezgru stanice. Ekspresija i aktivacija I $\kappa$ B $\alpha$  nakon tretiranja stanica s rhHsp70, LPS-om, LTA, CSE-om i njihovim kombinacijama ispitana je Western blot metodom u lizatima NCI-H292 i NHBE stanica te THP-1 stanica i monocita.

##### 4.3.4.1. Ispitivanje aktivacije NF- $\kappa$ B u stanicama plućnog epitela

Do fosforilacije I $\kappa$ B $\alpha$  dolazi nakon tretiranja **NCI-H292** s 0,3 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70, LPS-om, LTA te njihovim kombinacijama tijekom 2 i 8 h (prikazani su podaci za 2 h, slika 4.3.22.).

Nakon tretiranja stanica CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 ne može se detektirati p-I $\kappa$ B $\alpha$  (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.3.22.** Western blot analiza ekspresije ukupne I $\kappa$ B $\alpha$  (39 kDa) i aktivirane p-I $\kappa$ B $\alpha$  u lizatima NCI-H292 stanica tretiranih s LPS-om, LTA, rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 2 h.

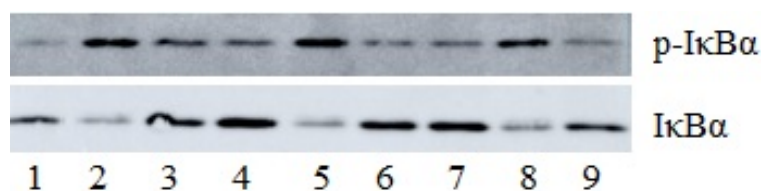
(1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70; (5) 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LPS; (6) 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LTA; (7) 3  $\mu$ g/ml rhHsp70; (8) 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LPS; (9) 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LTA

U **NHBE** stanicama pod ispitivanim uvjetima nije došlo do aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$ .



#### 4.3.4.2. Ispitivanje aktivacije NF- $\kappa$ B u stanicama monocitno-makrofagnog sustava

Nakon tretiranja THP-1 stanica s 0,3  $\mu$ g/ml Hsp70, LPS-om, LTA te kombinacijama LPS-a i 0,3 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 tijekom 30 minuta došlo je do značajne aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice (slika 4.3.23). Nakon 30 min također je došlo do značajne aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$  nakon tretiranja kombinacijom 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 i LPS-a, a nakon 2 i 8 h I $\kappa$ B $\alpha$  značajno se aktivirao samo nakon tretiranja LPS-om ili njegovim kombinacijama s rhHsp70 (podaci nisu prikazani). Nakon tretiranja stanica s CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 ne može se detektirati p-I $\kappa$ B $\alpha$  (podaci nisu prikazani).



**Slika 4.3.23.** Western blot analiza ekspresije ukupne I $\kappa$ B $\alpha$  (39 kDa) i aktivirane p-I $\kappa$ B $\alpha$  u lizatima THP-1 stanica tretiranih LPS-om, LTA, rhHsp70 te njihovim kombinacijama tijekom 30 minuta.

(1) netretirane stanice; (2) LPS; (3) LTA; (4) 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70; (5) 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LPS; (6) 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LTA; (7) 3  $\mu$ g/ml rhHsp70; (8) 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LPS; (9) 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 + LTA

U **monocitima** pod ispitivanim uvjetima nije došlo do aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$ .

#### 4.3.5. Utjecaj inhibitora na upalni odgovor na rhHsp70

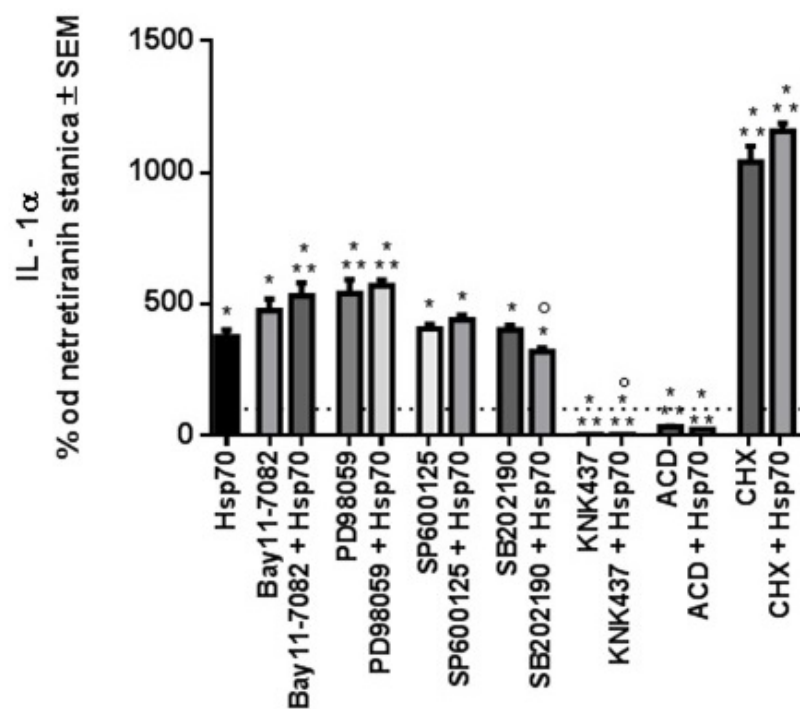
Kako bismo ispitali ulogu aktivacije TLR2 i TLR4 te MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova na upalni odgovor potaknut s rhHsp70, NCI-H292 i THP-1 stanice tretirane su inhibitorima: 10  $\mu$ M Bay11-7082, inhibitorom NF- $\kappa$ B; 50  $\mu$ M PD98059, inhibitorom ERK; 10  $\mu$ M SP600125, inhibitorom JNK; 10  $\mu$ M SB202190, inhibitorom p38 MAPK; 100  $\mu$ M KNK437, inhibitorom Hsp70; 10  $\mu$ g/ml aktinomicinom D (ACD), inhibitori sinteze mRNA (transkripcije) i 10  $\mu$ g/ml cikloheksimidom (CHX), inhibitorom sinteze proteina (translacije). Nakon 1 h pretretiranja pojedinim inhibitorom, stanicama je dodano 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 (NCI-H292) ili 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 (THP-1) te su stanice uz inhibitor i rhHsp70 inkubirane 24 h, a potom su u mediju iznad stanica određeni citokini IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 za NCI-H292 stanice, odnosno IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-8 za THP-1 stanice.

Primjena samih ACD-a i KNK437 u **NCI-H292** stanicama, kao i dodatak rhHsp70 nakon pretretiranja ovim inhibitorima, potisnula je lučenje **IL-1 $\alpha$** . Ostali primijenjeni inhibitori uzrokuju veće lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na netretirane stanice. SB202190 i SP600125 zajedno s rhHsp70 pokazuju značajni antagonistički tip interakcija iako koncentracije izlučenog IL-1 $\alpha$  nisu značajno različite od onih izlučenih nakon tretiranja samim rhHsp70.

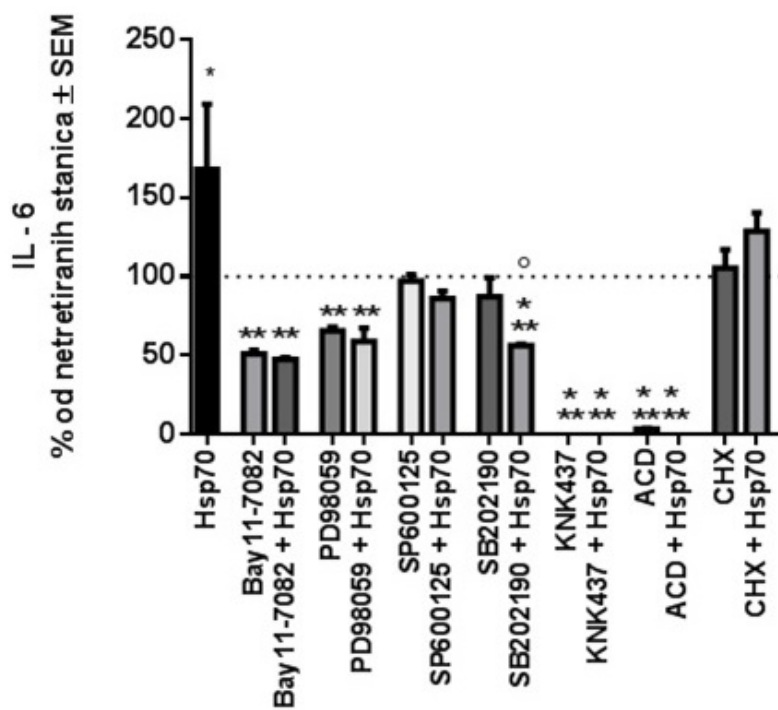
ACD i KNK437 inhibirali su lučenje **IL-6**, a lučenje ovog citokina ostaje inhibirano i nakon dodatka rhHsp70. Pretretiranje stanica sa SB202190 značajno potiskuje lučenje IL-6 nakon dodatka rhHsp70 u odnosu na IL-6 izlučen nakon tretiranja stanica samim rhHsp70, kao i pretretiranje s Bay11-7082 i PD98059.

Primjena CHX-a, ACD-a i KNK437 značajno je inhibirala lučenje **IL-8** u odnosu na netretirane stanice. Koncentracija IL-8 nakon primjene SP600125 ili PD98059 i rhHsp70 bila je značajno niža u odnosu na IL-8 izlučen nakon primjene samog rhHsp70 i samih inhibitora. Bay11-7082 i SB202190 značajno su inhibirali lučenje IL-8 nakon tretiranja s rhHsp70 u odnosu na IL-8 izlučen nakon tretiranja samim rhHsp70 (slika 4.3.24.).

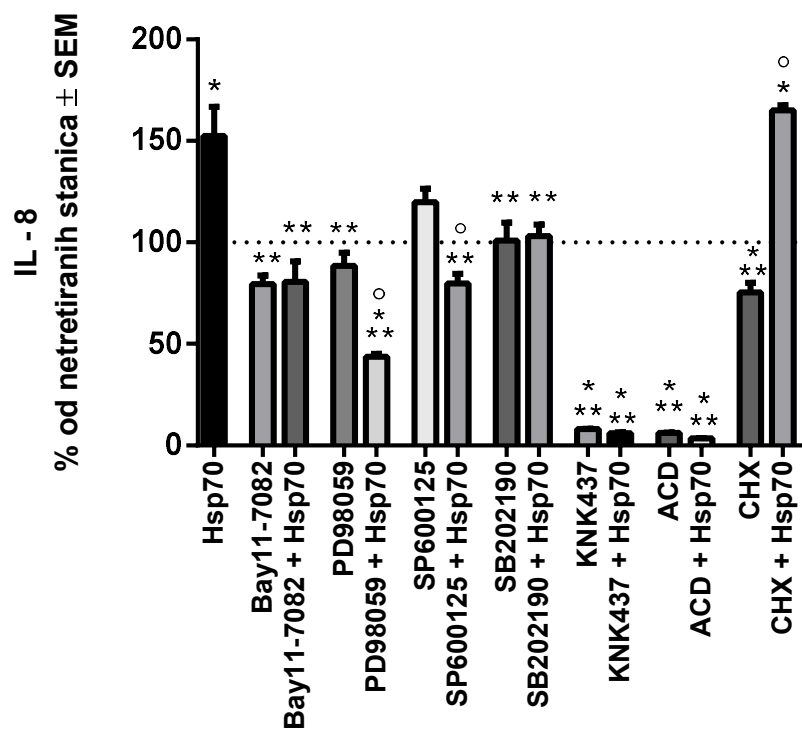
**a**



**b**



c



**Slika 4.3.24.** Grafički prikaz lučenja citokina IL-1 $\alpha$  (a), IL-6 (b) i IL-8 (c) u NCI-H292 stanicama pretretiranim inhibitorima tijekom 1 h te zatim tretiranim s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

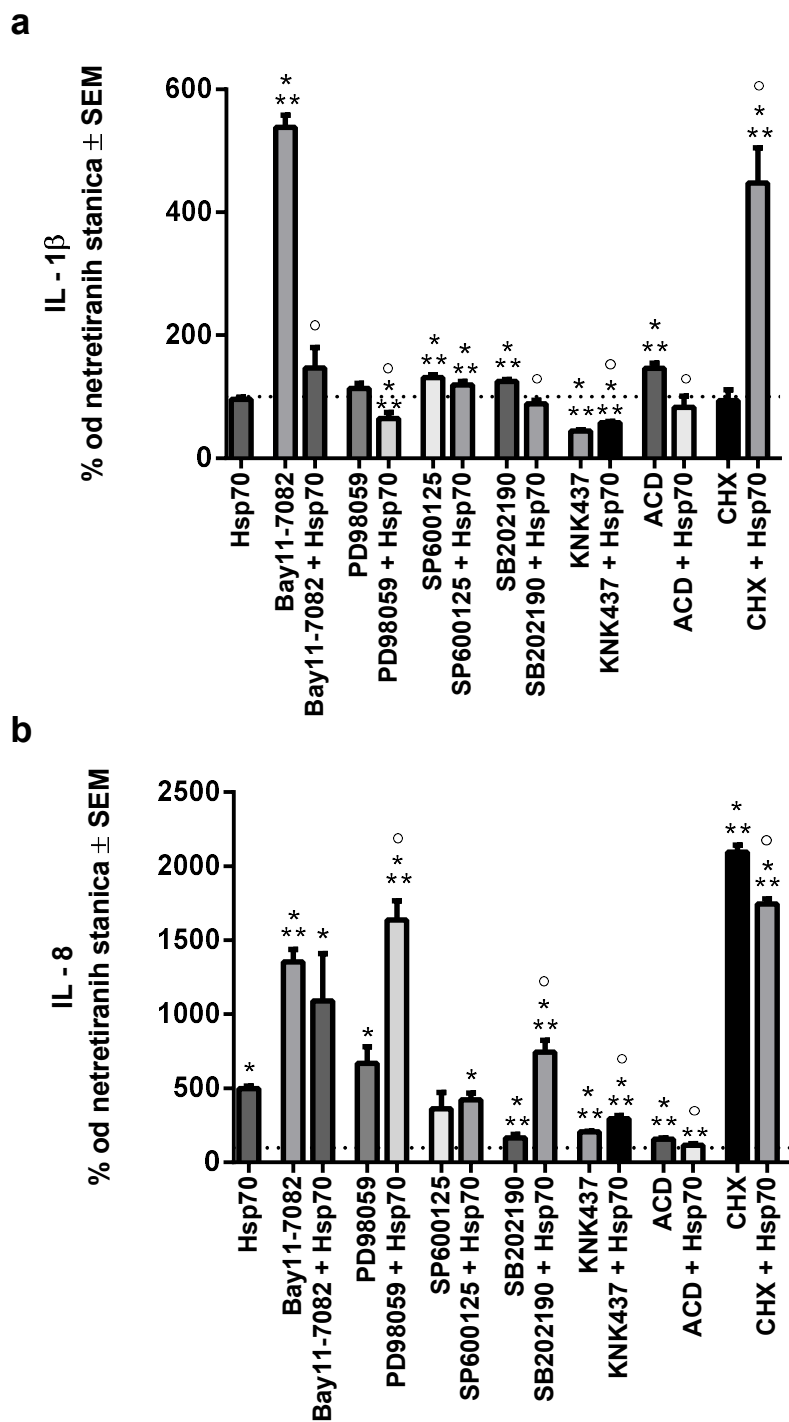
\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na rhHsp70

<sup>°</sup> statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na inhibitor

U **THP-1** stanicama pretretiranim inhibitorima **IL-1 $\alpha$**  nije se mogao detektirati.

Lučenje **IL-1 $\beta$**  značajno je potaknuto tretiranjem s Bay11-7082, SP600125, SB202190 i ACD-om u odnosu na netretirane stanice i sam rhHsp70, dok KNK437 značajno smanjuje lučenje IL-1 $\beta$  u odnosu na netretirane stanice i rhHsp70, koje se zadržava i nakon dodatka rhHsp70. PD98059 uz rhHsp70 uzrokuje značajno manje lučenje IL-1 $\beta$  u odnosu na sam rhHsp70. Bay11-7082 i SB202190 imaju značajno antagonistički tip interakcije s rhHsp70 iako se lučenje IL-1 $\beta$  nakon pretretiranja navedenim inhibitorima i dodatka rhHsp70 ne razlikuje u odnosu na IL-1 $\beta$  izlučen nakon tretiranja samim rhHsp70. CHX u kombinaciji s rhHsp70 ima značajno sinergističko djelovanje na lučenje IL-1 $\beta$ .

Svi ispitani inhibitori osim SP600125 induciraju lučenje **IL-8** u odnosu na netretirane stanice, a PD98059, SB202190 i CHX uzrokuju i značajno više lučenje IL-8 u kombiniranom tretiranju s rhHsp70 u odnosu na sam rhHsp70. Suprotno tome, ACD i KNK437 primijenjeni uz rhHsp70 potiskuju lučenje IL-8 u odnosu na sam rhHsp70. CHX pokazuje antagonistički tip interakcija s rhHsp70 unatoč tome što je koncentracija IL-8 značajno viša od one izlučene nakon tretiranja samim rhHsp70 (slika 4.3.25.).



**Slika 4.3.25.** Grafički prikaz lučenja IL-1 $\beta$  (a) i IL-8 (b) u THP-1 stanicama pretretiranim inhibitorima tijekom 1 h te zatim tretiranim s rhHsp70 tijekom 24 h.

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na netretirane stanice

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na rhHsp70

° statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na inhibitor

## **5. RASPRAVA**

Izvanstanični Hsp70 protein pripada skupini DAMP molekula, a može aktivirati stanice imunskog sustava vezujući se za TLR2 i TLR4 receptore te tako poticati sintezu upalnih citokina preko NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih putova (Ferat-Osorio i sur., 2014; Thériault i sur., 2005). U bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolešću i u nekim drugim upalnim bolestima izmjerene su povišene koncentracije eHsp70 u krvi (Cui i sur., 2015; Giuliano i sur., 2011; Midwood i Piccinini, 2010; Hacker i sur., 2009). Stoga je glavna hipoteza ovog istraživanja da sam izvanstanični Hsp70 može aktivirati imunski i upalni odgovor, ali da može i modulirati upalni odgovor izazvan patogenim bakterijama ili dimom cigareta u staničnim modelima KOPB-a.

KOPB je jedan od vodećih uzroka obolijevanja i smrtnosti u svijetu s prevalencijom od oko 12 % kod osoba starijih od 40 godina, a jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj bolesti je pušenje (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017). KOPB karakterizira progresivno ograničenje protoka zraka povezano s pojačanim kroničnim upalnim odgovorom u dišnim putovima i plućima na štetne čestice ili plinove, najčešće dim cigareta. Egzacerbacije i komorbiditeti pridonose ukupnoj težini kliničke slike pojedinih bolesnika. Bolesnici s KOPB-om razvijaju abnormalne upalne reakcije, a kronična upala može dovesti do razaranja parenhima pluća (emfizema) i kroničnog bronhitisa (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2017; Dong i sur., 2013). Osim plućnih manifestacija, KOPB također ima sistemsku komponentu koju karakterizira kronična upala, oksidacijski stres, aktivacija imunskih stanica i povišena koncentracija upalnih citokina u krvi (Agusti i Soriano, 2008; Agustí i sur., 2003). Stanice imunskog sustava, kao i epitelne stanice i fibroblasti, uključene su u upalni proces i mogu lučiti različite medijatore upale (Dong i sur., 2013; Rovina i sur., 2013; Barnes, 2009). Makrofagi su vrlo važne stanice u ovom procesu, a makrofagi u plućnom tkivu potječu od monocita iz krvi (Rufino i sur., 2006; Groneberg i Chung, 2004; Sutherland i Martin, 2003). Upala u KOPB-u može biti sterilna (posredovana DAMP-ovima), posredovana patogenima (PAMP-ovima) ili posljedica njihovog kombiniranog djelovanja. Bolesnici s KOPB-om su osjetljivi na povremene bakterijske kolonizacije i infekcije koje mogu dovesti do egzacerbacija i pogoršanja već aktivne upale (Sethi i sur., 2012; Wouters i sur., 2007; Sethi, 2006).

U ovom istraživanju korišteno je nekoliko staničnih modela plućne i sistemske komponente KOPB-a kako bi se obuhvatila cjelokupna kompleksnost KOPB-a. Za ispitivanje plućne komponente KOPB-a korišteni su tumorska stanična linija NCI-H292 te primarne bronhijalne



epitelne stanice izolirane od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om, a za ispitivanje sistemske komponente tumorska stanična linija THP-1 i primarni monociti iz periferne krvi izolirani od zdravih ispitanika.

Za oponašanje djelovanja izvanstaničnog Hsp70 korišten je rekombinantni humani Hsp70 protein. Istražen je utjecaj rhHsp70 kada je prisutan sam ili zajedno s dobro poznatim PAMP molekulama LPS-om i LTA te ekstraktom dima cigareta na upalni odgovor određivanjem koncentracije upalnih citokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ . Također je ispitan njihov utjecaj na vijabilnost stanica i način umiranja stanica MTS testom, određivanjem aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica te aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 u stanicama. Mehanizmi djelovanja ovih molekula ispitani su određivanjem aktivacije TLR2 i TLR4 receptora, MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova te korištenjem specifičnih inhibitora MAPK, NF- $\kappa$ B, Hsp70, transkripcije i translacije da bi se razjasnilo funkcionalno značenje aktivacije navedenih molekula.

### **5.1. Utjecaj izvanstaničnog Hsp70 na upalni odgovor i modulaciju upalnog odgovora u KOPB-u**

Povišene koncentracije IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  pronađene su u sputumu bolesnika u stabilnoj fazi KOPB-a (Keatings i sur., 1996). Uz to, zapaženo je povećano otpuštanje upalnih citokina IL-1, IL-8 i TNF- $\alpha$ , kao i protu-upalnog citokina IL-10, iz alveolarnih makrofaga pušača i bolesnika s KOPB-om (Chung, 2001; Sam i sur., 2000). Longitudinalno istraživanje KOPB-a provedeno s ciljem pronalaženja novih surogatnih biomarkera (ECLIPSE, *engl.* Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points) pokazalo je da oko 16 % bolesnika s KOPB-om ima „sistemiški inflamom“ te su im u krvi uz opće biljege upale povišeni i citokini IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  (Agusti i Sin, 2014; Faner i sur., 2013; Kelly i sur., 2013; Agusti i sur., 2012; Agusti i sur., 2010; Han i sur., 2010). Upravo stoga je u ovom istraživanju određivana koncentracija citokina za koje se smatra da imaju najznačajniju ulogu u upalnom procesu KOPB-a: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ .

### **5.1.1. rhHsp70 potiče izlučivanje citokina u staničnim modelima KOPB-a**

Ovo istraživanje pokazalo je da rhHsp70 u NCI-H292 stanicama potiče izlučivanje IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8. Lučenje IL-1 $\alpha$  raste s koncentracijom rhHsp70 od 0,3 do 3  $\mu$ g/ml, dok IL-6 raste s koncentracijom rhHsp70 od 0,1 do 3  $\mu$ g/ml, a s 10 i 30  $\mu$ g/ml pada na vrijednosti slične onima za 0,1  $\mu$ g/ml. Uz to, koncentracija izlučenog IL-8 raste do 1 i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 gdje je najviša, a slično kao i kod IL-6, s 10 i 30  $\mu$ g/ml rhHsp70 dobivaju se koncentracije IL-8 poput onih s 0,1  $\mu$ g/ml. NHBE stanice nisu bile osjetljive na sam rhHsp70, dok su 0,1, 0,3 i 1  $\mu$ g/ml rhHsp70 inducirali značajno otpuštanje IL-8 iz PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika i od bolesnika s KOPB-om. 0,1 i 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 u PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika i 0,3  $\mu$ g/ml rhHsp70 u PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om potaknuli su značajno lučenje IL-6. Zanimljivo je da je u PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om IL-1 $\alpha$  izlučen nakon tretiranja s rhHsp70 značajno niži u odnosu na netretirane stanice. Ovaj rezultat nije u skladu s očekivanjima budući da su u nekim prijašnjim istraživanjima ove stanice pokazale značajno lučenje IL-1 $\alpha$  nakon tretiranja različitim agensima koji uzrokuju stanični stres i upalni odgovor (Suwara i sur., 2014; Pauwels i sur., 2011). Moguće je da ili sam rhHsp70 ili neka druga molekula koja se pojačano sintetizira i/ili aktivira nakon ovog tretiranja, a nije određivana u ovom istraživanju, uzrokuje smanjeno proteolitičko kidanje pro-IL-1 $\alpha$ , a time i lučenje zrelog oblika IL-1 $\alpha$ , što bi se u budućnosti svakako trebalo detaljnije ispitati. S druge strane, kod THP-1 stanica rhHsp70 potiče izlučivanje IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-8, ali ne i IL-6 niti TNF- $\alpha$ , dok u monocitima potiče lučenje IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ . Koncentracije koje su potrebne da bi se induciralo izlučivanje IL-1 $\beta$  i IL-8 u THP-1 stanicama i monocitima uglavnom su više od onih u stanicama plućnog epitela (3-30  $\mu$ g/ml). Ferat-Osorio i sur. pokazali su sniženu ekspresiju gena za TNF- $\alpha$  nakon tretiranja s Hsp70 proteinom u monocitima, no koristili su niže koncentracije Hsp70 (Ferat-Osorio i sur., 2014).

U nekoliko prijašnjih istraživanja pronađeno je da rekombinantni Hsp70 stimulira upalni odgovor u različitim vrstama stanica uključujući, humane bronhijalne epitelne stanice i makrofage (Giuliano i sur., 2011; Mathur i sur., 2011; Wheeler i sur., 2009; Chase i sur., 2007).

Unatoč tome, neki znanstvenici ne slažu se da eHsp70 ima upalni učinak i pripisuju ga kontaminaciji rekombinantnog Hsp70 proteina endotoksinom, odnosno LPS-om, obzirom da se on sintetizira u bakteriji *E. coli* (De Maio i Vazquez, 2013; Tsan i Gao, 2004). Stoga je u ovom istraživanju, da se isključi ova mogućnost, korišten rhHsp70 s niskom koncentracijom endotoksina. Koncentracija endotoksina određena je od strane proizvođača LAL testom i

iznosila je 2,7 EU/mg pročišćenog proteina. Jednaka koncentracija LPS-a korištena je kao negativna kontrola u svim pokusima te ona nije inducirala upalni odgovor (podaci nisu prikazani). Također su provedeni i preliminarni pokusi na NCI-H292 i THP-1 stanicama gdje je ispitan utjecaj polimiksina B (inhibitora LPS-a), kuhanja rhHsp70 na 100 °C (uzrokuje njegovu denaturaciju) te specifičnih protutijela naspram Hsp70, TLR2 i TLR4. Ovi pokusi potvrdili su da upalna djelovanja rhHsp70 zaista potječu od samog rhHsp70, a ne od kontaminacije endotoksinom ili nekim drugim kontaminantom.

### ***5.1.2. rhHsp70 modulira upalni odgovor na bakterijske komponente LPS i LTA***

LPS je komponenta vanjske membrane Gram-negativnih bakterija i potiče upalni odgovor putem TLR4 receptora, dok je LTA komponenta stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija i uzrokuje upalni učinak putem TLR2 receptora. Aktivacija TLR2 i TLR4 može inducirati NF- $\kappa$ B i MAPK signalne putove te potaknuti sintezu i lučenje IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 i TNF- $\alpha$  (Vinokurov i sur., 2012; Dokladny i sur., 2010; Hutchison i sur., 2000). U ovom istraživanju LPS je očekivano potaknuo značajno lučenje IL-6 i IL-8 u NCI-H292 stanicama, IL-1 $\alpha$  u NHBE stanicama, IL-8 u PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u THP-1 stanicama te IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u monocitima. LTA je potaknuo značajno lučenje IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 u NCI-H292 stanicama, IL-6 u NHBE stanicama, IL-8 u PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika, IL-6 i IL-8 u PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u THP-1 stanicama te IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u monocitima. Tretiranje LPS-om uglavnom je imalo snažniji učinak od tretiranja s LTA, osim na primarnim stanicama plućnog epitela, što se može objasniti sniženom ekspresijom TLR4 receptora u odnosu na TLR2 u ovim stanicama (Becker i sur., 2005). Hutchison i sur. pokazali su da LPS iz različitih Gram-negativnih bakterija inducira lučenje upalnih citokina (Hutchison i sur., 2000), a druge istraživačke skupine također su dokazale lučenje citokina nakon stimulacije LPS-om iz različitih stanica, uključujući plućne epitelne stanice i makrofage (Fan i sur., 2016; Lykhmus i sur., 2016; Koch i sur., 2014; He i sur., 2013; Rossol i sur., 2011; Meng i Lowell, 1997; Verhasselt i sur., 1997). Pokazalo se da LTA inducira otpuštanje citokina iz BEAS-2B bronhijalnih epitelnih stanica i NK stanica (Jang i sur., 2015; Koch i sur., 2014; Cheng i sur., 2013; Rockel i Hartung, 2012; Wellnitz i sur., 2011; Hsieh i sur., 2010). Suprotno tome, u ovom su radu LPS i LTA potisnuli lučenje IL-1 $\alpha$  u PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om. Potisnuto otpuštanje IL-1 $\alpha$  iz PBEC stanica nije očekivani rezultat obzirom na to da je lučenje ostalih citokina uglavnom bilo povišeno, ali moguće je da postoji neki mehanizam koji onemogućava

izlučivanje IL-1 $\alpha$  iz ovih stanica, poput lučenja medijatora upale koji inhibiraju IL-1, primjerice IL-4, IL-10 ili TGF- $\beta$  (Zissel, 1996).

Bakterijske kolonizacije i infekcije ponekad su prisutne u bolesnika s KOPB-om, naročito u egzacerbacijama, te smo stoga istražili kombinirana djelovanja rhHsp70 i LPS-a ili LTA na upalni odgovor. U NCI-H292 stanicama kombinacije rhHsp70 i LPS-a uzrokuju značajno više lučenje IL-6 i IL-8 u odnosu na sam LPS, no primjenom matematičko-statističkog modela ovaj učinak je nedovoljan da bude sinergističkog tipa, dok kombinacije rhHsp70 i LTA pokazuju značajan antagonistički tip interakcija na lučenje sva tri određivana citokina. U primarnim plućnim epitelnim stanicama koje nisu izolirane od bolesnika s KOPB-om uglavnom nema značajnih izračunatih interakcija između rhHsp70 i LPS-a ili LTA, osim za IL-1 $\alpha$  u PBEC stanicama gdje su kombinacije LPS-a ili LTA i rhHsp70 uzrokovale lučenje više IL-1 $\alpha$  u odnosu na stanice tretirane samim LPS-om ili LTA. Budući da su rhHsp70 i LPS ili LTA zasebno snižavali koncentraciju IL-1 $\alpha$ , taj učinak je antagonističkog tipa. U PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om pronađen je značajan antagonistički tip djelovanja i LPS-a i LTA na lučenje IL-1 $\alpha$  i IL-8.

U THP-1 stanicama kombinacije LPS-a i rhHsp70 uzrokovale su značajno više lučenje IL-6 i TNF- $\alpha$  u odnosu na sam LPS te je ovaj učinak bio sinergističkog tipa, dok su na lučenje IL-8 interakcije bile antagonističkog tipa za LPS i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70. LTA i rhHsp70 pokazali su značajan antagonistički tip interakcija na lučenje IL-1 $\alpha$  i IL-8, dok je tip interakcija na lučenje TNF- $\alpha$  bio sinergistički.

Može se zaključiti da LPS i rhHsp70 uglavnom nemaju značajne međusobne interakcije, a ako one postoje uglavnom su sinergističkog tipa, dok su interakcije između LTA i rhHsp70 izraženije i uglavnom su antagonističkog tipa. No, ove interakcije ovise o određivanom citokinu i vrsti stanica, a također ovise i o vremenu izloženosti stanica ovim agensima (Hulina i sur., 2017).

Prethodna istraživanja pokazala su da se eHsp70 u većoj mjeri veže za TLR2 nego za TLR4 receptore (Mathur i sur., 2011; Joly i sur., 2010; Jean-Pierre i sur., 2006) te bi ovi antagonistički učinci LTA i rhHsp70 mogli biti posljedica modulacije osjetljivosti receptora s eHsp70 i interferencija s vezanjem LTA, dok eHsp70 ne interferira u vezanju LPS-a za TLR4 receptor (Bangen i sur., 2007). Uz to, eHsp70 može imati utjecaj na ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora (Tulapurkar i sur., 2015; Jean-Pierre i sur., 2006). Moguće objašnjenje za ovo je i lučenje ili povećana ekspresija molekula koje bi mogle imati utjecaja na kombinirano djelovanje LPS-a i LTA s rhHsp70 aktivacijom pozitivne ili negativne povratne sprege koja bi

dovela do povećanog ili smanjenog odgovora receptora na podražaje (Gupta i sur., 2013; Aneja i sur., 2006; Quintana i Cohen, 2005). Neki autori navode da ponavljajuće vezanje eHsp70 na TLR2 i TLR4 receptore može dovesti do negativne regulacije imunskog odgovora i smanjenog odgovora TLR2 i TLR4 receptora na podražaje snažnijim upalnim čimbenicima poput, primjerice, bakterijskih komponenti LPS-a i LTA (Quintana i Cohen, 2005). Nekoliko istraživanja pokazalo je da primjena eHsp70 prije LPS-a može uzrokovati toleranciju na endotoksin te djelovati zaštitno i spriječiti sepsu u štakora (Tulapurkar i sur., 2015; J.-H. i sur., 2014; Garcia i sur., 2013; Abboud i sur., 2008; Aneja i sur., 2006). Osim toga, eHsp70 može izazivati različite biološke odgovore i aktivacijom nekih drugih receptora (osim TLR2 i TLR4), kao što su CD40, CD91, receptori „čistači“ i lektinski receptori (Thériault i sur., 2005).

### ***5.1.3. rhHsp70 modulira upalni odgovor na CSE***

Pušenje, odnosno dim cigareta, jedan je od glavnih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a te je poznato da ukoliko izložimo stanice ekstraktu dima cigareta dolazi do povećane sinteze upalnih citokina, naročito IL-8 (Heijink i sur., 2015; Pace i sur., 2014; Dong i sur., 2013; Overbeek i sur., 2013; Mortaz i sur., 2011; Mortaz i sur., 2009; Sarir i sur., 2009; van der Vaart i sur., 2004; Mio i sur., 1997). Stoga su u ovom radu stanice tretirane ekstraktom dima cigareta i njegovim kombinacijama s rhHsp70. Iako postoje mnogobrojna istraživanja o utjecaju dima cigareta na unutarstanični Hsp70, njegova međusobna interakcija s eHsp70 nije dobro istražena.

U NCI-H292 stanicama CSE je uzrokovao značajno povišeno lučenje IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 u niskoj (2,5 %) i visokoj (15 %) koncentraciji. U NHBE stanicama 2,5 i 15 % CSE uzrokovali su značajno lučenje IL-6, dok je lučenje IL-8 potaknuto samo visokom koncentracijom (15 %) CSE-a. U PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om 2,5 % CSE-a uzrokuje značajno lučenje IL-6 i IL-8, dok 15 % CSE uzrokuje značajno lučenje IL-8. CSE također uzrokuje sniženu koncentraciju IL-1 $\alpha$  u mediju iznad PBEC stanica. Osei i sur. kultivirali su PBEC stanice zajedno s plućnim fibroblastima i tretirali ih CSE-om te su utvrdili povišenu ekspresiju mRNA za IL-1 $\alpha$  (Osei i sur., 2016). U istom modelu neutralizirajuća protutijela na IL-1 $\alpha$  smanjila su lučenje IL-8. Nekoliko drugih autora također navodi ovisnost upale izazvane dimom cigareta o IL-1 $\alpha$  u plućnim stanicama (Botelho i sur., 2011; Pauwels i sur., 2011). Budući da se u ovom istraživanju za ove stanice dobivaju snižene koncentracije IL-1 $\alpha$  u svim ispitivanim uvjetima, što nije u skladu s očekivanim prema dostupnim literaturnim podacima (Borthwick, 2016; Suwara i sur., 2014), niti s trendom ponašanja

ostalnih određivanih citokina (povišeno lučenje), može se pretpostaviti da se radi o nekom mehanizmu koji ili inhibira sintezu IL-1 $\alpha$  ili njegovo izlučivanje iz stanica. U THP-1 stanicama i monocitima uz CSE je došlo do izlučivanja samo IL-8 i to u THP-1 stanicama s 2,5 % i 5 % CSE-a, dok je u monocitima do značajno višeg lučenja IL-8 u odnosu na netretirane stanice došlo nakon tretiranja samo s 2,5 % CSE-a. Ovi podaci slažu se s prethodnim istraživanjima gdje je upravo IL-8 citokin koji je najjače induciran CSE-om (Kode i sur., 2006; Walters i sur., 2005), dok IL-6 i TNF- $\alpha$  mogu biti i sniženi u makrofagima (van der Vaart i sur., 2004).

U kombiniranim tretiranjima rhHsp70 i CSE-a u NCI-H292 stanicama dodatak rhHsp70 potiskuje izlučivanje sva tri određivana citokina u odnosu na sam 2,5 % CSE te su njihove interakcije antagonističkog tipa, no kod viših koncentracija CSE-a takva međusobna djelovanja uglavnom nisu opažena, osim pri lučenju IL-1 $\alpha$  u kombinaciji 15 % CSE-a s 1 ili 3  $\mu$ g/ml rhHsp70. U NHBE stanicama koncentracija IL-1 $\alpha$  nakon tretiranja s 15 % CSE-a i rhHsp70 značajno je viša u odnosu na sam 15 % CSE i pokazuje sinergistički tip interakcija, a koncentracija IL-6 također je značajno viša u odnosu na sam CSE, no ipak nema interakcija sinergističkog tipa. U PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika kombinacije CSE-a i rhHsp70 nemaju značajnog utjecaja na lučenje IL-6 i IL-8, dok značajno snižuju koncentraciju izlučenog IL-1 $\alpha$  te pokazuju antagonistički tip interakcija. Isto se događa s IL-1 $\alpha$  i u PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om, dok u istim stanicama CSE i rhHsp70 pokazuju antagonistički tip učinka i na lučenje IL-8. U THP-1 stanicama kombinacije CSE-a i rhHsp70 ne uzrokuju značajno različito lučenje IL-8 u odnosu na sami CSE, dok u monocitima 2,5 % CSE i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 te 5 % CSE u kombinaciji s rhHsp70 uzrokuju značajno više lučenje IL-8 od samog CSE-a, ali je za 5 % CSE-a i 3  $\mu$ g/ml rhHsp70 to je djelovanje antagonističkog tipa pošto je kombinirani učinak ipak značajno manji od očekivanog povećanja koncentracije IL-8.

Može se zaključiti da kombinirani učinak CSE-a i rhHsp70 ovisi o ispitivanim koncentracijama i citokinu, no kod nižih koncentracija CSE-a on je uglavnom antagonističnog tipa, dok se kod viših koncentracija CSE-a to zaštitno djelovanje rhHsp70 gubi. Uz to, ovi učinci jače su izraženi na stanicama plućnog epitela, a slabije na stanicama monocitno-makrofagnog sustava.

U prethodnim istraživanjima pokazano je da eHsp70 može djelovati zaštitno na zadebljanje karotidne arterije uzrokovano dimom cigareta u miševima (Matsumoto i Seya, 2008). Promjena koncentracije eHsp70 opažena je u serumu miševa izloženih CSE-u, a različita je i u serumu ljudi ovisno o pušačkom statusu te o godinama pušenja (Newkirk i sur., 2012).

Također je pokazano da CSE može izazvati lučenje Hsp70 iz plućnih fibroblasta, a izlučivanje IL-8 uzrokovano CSE-om smanjeno je dodatkom siRNA koja inhibira sintezu Hsp70 (C.-J. Li i sur., 2007). Dong i sur. pokazali su da protutijela na izvanstanični Hsp70 smanjuju izlučivanje IL-8 inducirano CSE-om u 16HBE stanicama (Dong i sur., 2013). Nijedno od ovih istraživanja nije provedeno uz istovremenu primjenu CSE-a i rhHsp70 na stanicama, a iz rezultata našeg istraživanja možemo zaključiti da izvanstanični Hsp70 uglavnom djeluje zaštitno uz niže koncentracije CSE-a, dok je kod viših koncentracija izraženije kombinirano djelovanje oba agensa, a konačan učinak je ovisan i o vrsti stanica. Uz to, za sva tretiranja CSE-om treba uzeti u obzir činjenicu da ne postoji jedinstvena standardizirana metoda pripreme CSE-a te stoga čak i istovjetne niske i visoke koncentracije CSE-a različitih istraživačkih timova ne moraju nužno izazvati slične upalne odgovore. Također je bitno naglasiti da osim o koncentraciji CSE-a odgovor stanica ovisi i o broju stanica, njihovoj gustoći na pločama, volumenu CSE otopine s kojim su stanice tretirane te o sastavu medija u kojem je CSE otopljen (Bourgeois i sur., 2016).

#### ***5.1.4. Djelovanje rhHsp70 na upalni odgovor ovisi o vrsti stanica***

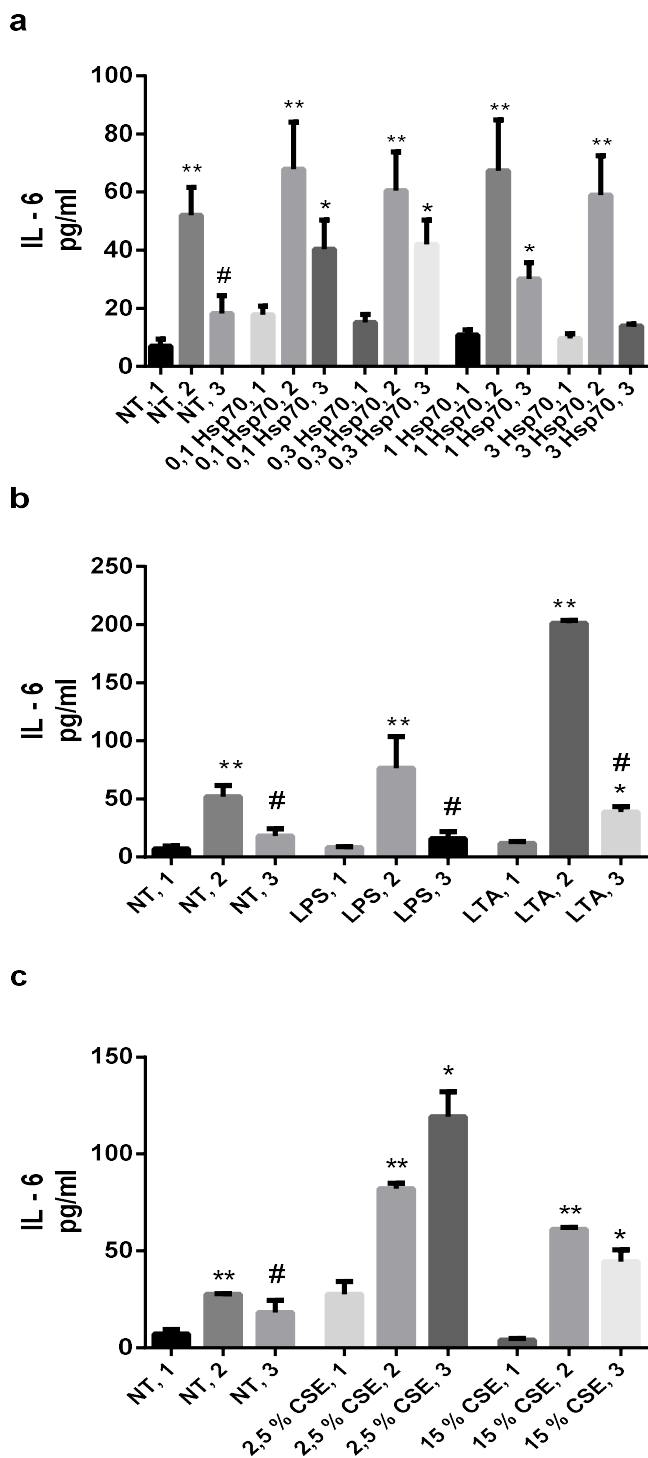
Zanimljivo je usporediti djelovanje ispitivanih agenasa na različite stanice, tako da se može zaključiti da su za izazivanje upalnog odgovora na stanicama plućnog epitela potrebne manje koncentracije rhHsp70 nego na stanicama monocitno-makrofagnog sustava. Interakcije između LPS-a i LTA više su izražene na stanicama monocitno-makrofagnog sustava, iako postoje i na stanicama plućnog epitela, naročito između LTA i rhHsp70. CSE izaziva lučenje citokina iz svih stanica već u koncentraciji od 2,5 %, a iz stanica plućnog epitela potiče lučenje više različitih citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8) nego iz stanica monocitno-makrofagnog sustava gdje potiče lučenje samo IL-8. Učinak kombinacija rhHsp70 i CSE-a više je izražen na stanicama plućnog epitela i to uz primjenu nižih koncentracija CSE-a.

Budući da je u središtu ovog istraživanja KOPB, zanimljivo je usporediti djelovanja rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na primarne stanice plućnog epitela: NHBE i PBEC stanice izolirane od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om (slike 5.1. i 5.2.).

Netretirane NHBE stanice izlučuju najviše IL-6 te se koncentracija ovog citokina značajno razlikuje od one izlučene iz netretiranih PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika i od bolesnika s KOPB-om, dok se IL-8 otpušta značajno više iz netretiranih NHBE stanica u odnosu na PBEC stanice od zdravih osoba. rhHsp70 potiče značajan upalni odgovor (lučenje citokina) u PBEC stanicama, dok u NHBE stanicama ne dolazi do značajno različitog lučenja ispitivanih citokina nakon tretiranja s rhHsp70. Koncentracije IL-6 i IL-8 izlučene iz PBEC

stanica izoliranih od bolesnika s KOPB-om značajno su više od onih izlučenih iz PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika nakon stimulacije stanica s rhHsp70. Nakon stimulacije LPS-om PBEC stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om luče značajno više IL-1 $\alpha$  u odnosu na NHBE stanice i PBEC stanice izolirane od zdravih ispitanika, dok NHBE stanice luče najviše IL-6. Nakon stimulacije s LTA NHBE stanice luče najviše IL-6 (kao i uz LPS), dok PBEC stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om izlučuju najviše IL-8. Nakon tretiranja CSE-om, koncentracije IL-6 i IL-8 izlučene iz PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika značajno su niže u odnosu na citokine izlučene iz PBEC stanica izoliranih od bolesnika s KOPB-om i NHBE stanica. Ovi rezultati slažu se s prethodnim istraživanjima, gdje su pronađene razlike u izlučenim upalnim medijatorima ili u ekspresiji mRNA za upalne medijatore između stanica izoliranih od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om nakon stimulacije različitim čimbenicima, a osim za plućne stanice to je pokazano i za mezenhimalne stromalne stanice izolirane iz koštane srži te za neutrofile i makrofage (Broekman i sur., 2016; Osei i sur., 2016; Schneider i sur., 2010; Oudijk i sur., 2005; Spira i sur., 2004; Frankenberger i sur., 1996). Važno je napomenuti da su NHBE stanice korištene u ovom radu izolirane uglavnom od zdravih pušača (n=4 od pušača, n=1 od nepušača), a PBEC stanice od zdravih donora pluća za koje se može pretpostaviti da su nepušači ili barem bivši pušači, no zbog etičkih razloga podaci o donorima nisu dostupni. PBEC stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om potječu od pušača i bivših pušača s uznapredovalom bolešću, tj. koji su u GOLD III i GOLD IV stadiju KOPB-a. Moguće je da ove razlike u upalnim odgovorima na različite agense potječu zbog razlika u pušačkom statusu zdravih ispitanika od kojih su stanice izolirane, uz pretpostavku da su PBEC stanice od nepušača, dok je snažan upalni odgovor stanica izoliranih od bolesnika s KOPB-om posljedica poremećene regulacije upale u KOPB-u i/ili njihovog pušačkog statusa (pušači i bivši pušači).





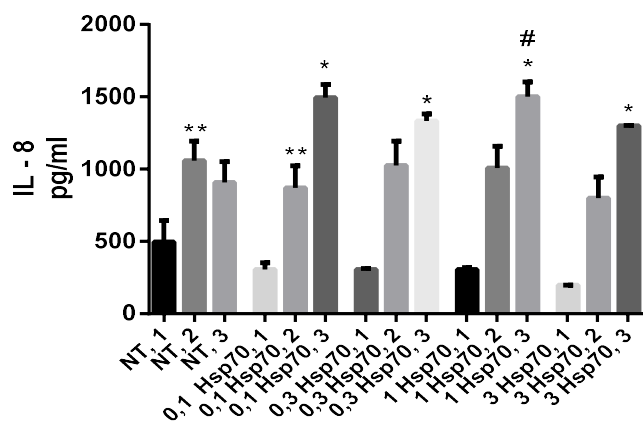
**Slika 5.1.** Usporedba lučenja IL-6 između PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika (1), NHBE stanica (2) te PBEC stanica izoliranih od bolesnika s KOPB-om (3) tretiranih s rhHsp70 (a), LPS-om i LTA (b) i CSE-om (c).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) 1 u odnosu na 3

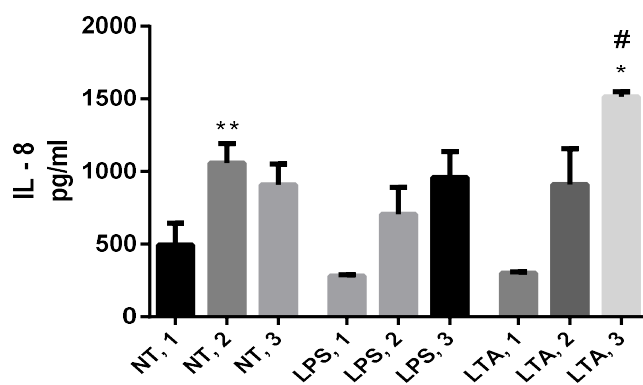
\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) 1 u odnosu na 2

# statistički značajno ( $P < 0,05$ ) 2 u odnosu na 3

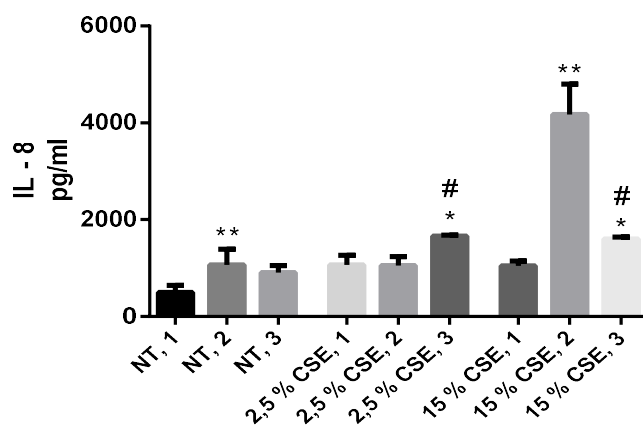
**a**



**b**



**c**



**Slika 5.2.** Usporedba lučenja IL-8 između PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika (1), NHBE stanica (2) te PBEC stanica izoliranih od bolesnika s KOPB-om (3) tretiranih s rhHsp70 (a), LPS-om i LTA (b) i CSE-om (c).

\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) 1 u odnosu na 3

\*\* statistički značajno ( $P < 0,05$ ) 1 u odnosu na 2

# statistički značajno ( $P < 0,05$ ) 2 u odnosu na 3

## **5.2. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA, CSE-a i njihovih kombinacija s rhHsp70 na vijabilnost i način umiranja stanica**

Osim upale, stanična smrt je važan aspekt razumijevanja mehanizama bolesti. Aktivacija TLR2 i TLR4 receptora može dovesti do upale i/ili programirane stanične smrti. Upala također može dovesti do nekrozne smrti stanica što uzrokuje otpuštanje staničnog sadržaja u izvanstanični prostor i daljnje poticanje upale. Nekrozne su stanice normalno imunostimulirajuće, dok su apoptozne stanice imunološki neaktivne (Vanden Berghe i sur., 2014; Ofengeim i Yuan, 2013; Zhang i sur., 2010). Apoptoza ili programirana stanična smrt važna je za normalno funkcioniranje imunosnog sustava, a poremećena apoptoza povezana je s različitim bolestima (Elmore, 2007). Kaspaze imaju središnju ulogu u procesu apoptoze. Mogu se aktivirati unutrašnjim ili mitohondrijskim apoptoznim putem kojeg karakterizira aktivacija inicijacijske kaspaze-9 ili vanjskim apoptoznim putem preko receptora smrti kojeg karakterizira aktivacija inicijacijskih kaspaza-2, -8 i/ili -10. Oba puta završavaju aktivacijom izvršnih kaspaza-3, -6 i/ili -7. Kada se aktiviraju, ove izvršne kaspaze kidaju brojne različite supstrate, uzrokujući na taj način apoptozno umiranje stanica (Duprez i sur., 2009).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da rhHsp70 nije utjecao na metaboličku aktivnost stanica (NCI-H292, NHBE, THP-1 i monocita), što je ispitano MTS testom. Mjerenje aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica pokazalo je da u NCI-H292 stanicama dolazi do pojačane propusnosti stanične membrane nakon tretiranja s 1 i 30 µg/ml rhHsp70, a u THP-1 stanicama nakon tretiranja s 0,3, 1 i 30 µg/ml rhHsp70. U primarnim stanicama 0,3 µg/ml rhHsp70 za NHBE i 30 µg/ml rhHsp70 za monocite djeluju zaštitno te smanjuju otpuštanje LDH.

### ***5.2.1. rhHsp70 djeluje zaštitno naspram citotoksičnosti bakterijskih komponenti LPS-a i LTA***

LPS, LTA i njihove kombinacije s rhHsp70 nisu značajno utjecale na metaboličku aktivnost NCI-H292 stanica, no doveli su do značajne promijene u integritetu stanične membrane i otpuštanju LDH. Ipak rhHsp70 ima zaštitni utjecaj te je kombinirani učinak rhHsp70 i LPS-a ili LTA značajno antagonističnog tipa. LPS, LTA i kombinacija LTA s 1 µg/ml rhHsp70 značajno su smanjili metaboličku aktivnost NHBE stanica, dok su kombinacije 0,3 µg/ml rhHsp70 i LPS-a ili LTA djelovale zaštitno na otpuštanje LDH iz ovih stanica. U THP-1 stanicama LTA je izazvala značajno smanjenje metaboličke aktivnosti, dok su i LPS i LTA izazvali značajan poremećaj u integritetu stanične membrane ovih stanica. Djelovanje na

lučenje LDH uzrokovano LPS-om i LTA bilo je antagonističkog tipa ovisnog o primijenjenoj koncentraciji. LTA u kombinaciji s 3 µg/ml rhHsp70 djelovao je značajno citotoksično na monocite, dok su LPS i LTA uzrokovali značajno pojačano lučenje LDH koje je kombinacija s rhHsp70 uspjela potisnuti.

U prethodnim istraživanjima eHsp70 nije uzrokovao citotoksične učinke na HL-60 stanicama promijelocitne leukemije (Wheeler i sur., 2009) i na neutrofilima (Vinokurov i sur., 2012). LTA je smanjio vijabilnost dermalnih fibroblasta samo ukoliko su bile primijenjene visoke koncentracije (Liu i sur., 2012), a nije utjecala na vijabilnost A549 alveolarnih epitelnih stanica (Liu i sur., 2010). Huang i sur. utvrdili su da samo koncentracije LPS-a veće od 10 µg/ml smanjuju vijabilnost THP-1 stanica (Huang i sur., 2012), dok LPS ne utječe na vijabilnost BEAS-2B bronhijalnih epitelnih stanica (J. Verspohl i Podlogar, 2012), a čak povećava vijabilnost A549 stanica (Hattar i sur., 2013). Koff i sur. pokazali su da samo koncentracije LPS-a veće od 300 µg/ml utječu na integritet membrane NCI-H292 stanica, no oni su određivali udio LDH izlučene u medij u odnosu na ukupnu LDH (u staničnom lizatu i mediju iznad stanica) (Koff i sur., 2006), dok je u ovom istraživanju određivana samo LDH izlučena u mediju. U jednom je istraživanju opaženo da LPS i LTA dovode do povećanog oslobađanja LDH u okolni medij na stanicama goveđih mliječnih žlijezda te da je odgovor nešto jači nakon primijene LPS-a (Wellnitz i sur., 2011). Moguće je da do neslaganja u rezultatima između MTS testa i izlučene LDH dolazi zbog razlike u načinu nasađivanja stanica (ploče s 12 ili 24 jažice za LDH, a 96 jažica za MTS), broju i gustoći stanica u jažici i volumenu medija u kojem su stanice tretirane, a druga je mogućnost da je do razlike došlo zbog određivanja samo LDH izlučene u medij iznad stanica, dok bi se određivanjem udjela izlučene LDH u odnosu na ukupnu LDH možda dobilo bolje slaganje s MTS testom (Koff i sur., 2006). Iako je dobro poznata zaštitna uloga unutarstaničnog Hsp70 (potiče preživljavanje stanica i djeluje protu-apoptozno), uloga eHsp70 nije dobro istražena. Prema rezultatima dobivenim u ovom radu rhHsp70 djeluje zaštitno, tj. potpomaže očuvanje integriteta stanične membrane i smanjuje aktivnost LDH izlučene u medij iznad stanica ukoliko se kombinira s LPS-om ili LTA. Ova opažanja slažu se s nekim drugim istraživanjima prema kojima je eHsp70 djelovao zaštitno na način da je potisnuo citotoksičnost raznih agenasa, poput LPS-a i LTA, na različitim vrstama stanica, uključujući THP-1 stanice, monocite i U937 stanice limfoma (Franco i sur., 2016; Yurinskaya i sur., 2016; Vinokurov i sur., 2012; Rozhkova i sur., 2010; Aneja i sur., 2006). Ipak, ova istraživanja razlikuju se u tome da su stanice prvo tretirane s eHsp70, a tek onda pojedinim agansom, dok smo u našem istraživanju istovremeno dodavali rhHsp70 i LPS ili LTA.

Kod staničnih kultura određivanjem LDH otpuštene u stanični medij ne može se pouzdano razlikovati nekroza od apoptozne smrti stanice. U *in vivo* uvjetima normalno je da se apoptozne stanice fagocitiraju dok im je njihova stanična membrana još netaknuta. Ipak, kada je uklanjanje apoptoznih stanica odgođeno ili spriječeno, apoptozne stanice podliježu daljnjim degenerativnim promjenama koje dovode do gubitka integriteta stanične membrane. Taj se proces naziva “sekundarna” nekroza. Za razliku od stanica koje primarno umiru nekrozom, stanice koje podlegnu sekundarnoj nekrozi i dalje pokazuju morfološke promjene u jezgri tipične za apoptozu (kondenzacija kromatina). Sekundarna nekroza apoptoznih stanica normalna je pojava kod staničnih kultura i mora se uzeti u obzir pri određivanju načina umiranja stanica *in vitro*. Stanice u kulturi koje umiru apoptozom rano se odvajaju od susjednih stanica, tj. odižu se od podloge i plutaju u staničnom mediju. Na taj način te stanice uglavnom izbjegnu fagocitiranje susjednim adherentnim stanicama i podliježu sekundarnoj nekrozi. Tijekom sekundarne nekroze organele apoptoznih stanica bubre, a stanična membrana gubi integritet (pa se izlučuje LDH) te konačno dolazi do kidanja organela i stanične membrane.

Način umiranja stanica u ovom radu ispitan je određivanjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9. U NCI-H292 stanicama došlo je do aktivacije mitohondrijskog apoptoznog puta (kaspaza-9) nakon 2 h tretiranja s rhHsp70 te puta receptora smrti (kaspaza-8) nakon 8 h tretiranja s rhHsp70. No, nakon 2 i 8 h tretiranja s rhHsp70 aktivnost kaspaza-3/7 bila je značajno snižena. LPS i LTA nisu doveli do aktivacije nijedne od ispitivanih kaspaza. U NHBE stanicama nakon tretiranja s rhHsp70 ili LPS-om i njihovim kombinacijama nije došlo do promjene u aktivnosti ispitivanih kaspaza, dok je LTA aktivirao kaspazu-3/7 nakon 2 h tretiranja, no kombinacija LTA i rhHsp70 smanjila je ovu aktivnost. U THP-1 stanicama aktivnost kaspaza-3/7 bila je značajno snižena nakon 8 h tretiranja s rhHsp70. LPS je aktivirao kaspazu-8 nakon 6 i 8 h tretiranja, a rhHsp70 na ovu aktivaciju nije imao značajnog učinka, dok su rhHsp70 i LPS pokazali antagonistički tip interakcija na kaspazu-9 nakon 6 h. U monocitima je 10 µg/ml rhHsp70 potisnulo aktivaciju kaspaze-9. LPS je u ovim stanicama značajno aktivirao kaspaze-3/7 i -9 nakon 6 h tretiranja. rhHsp70 ima značajan sinergistički tip interakcija s LPS-om i LTA na aktivaciju kaspaze-9 nakon 6 h, no ovaj učinak smanjuje se nakon 8 h tretiranja te rhHsp70 u kombinaciji s LPS-om ili LTA potiskuje aktivnost kaspaze-9. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da rhHsp70 ima ulogu u potiskivanju aktivnosti kaspaza, naročito kaspaza-3/7, pa stoga djeluje zaštitno i sprječava aktivaciju apoptoznog programa kojeg potiču LPS ili LTA, no ovaj učinak ovisi o primijenjenim koncentracijama, vremenima tretiranja i vrsti stanica. Apoptozno djelovanje LPS-a poznato je otprije (Munshi i

sur., 2002; Xaus i sur., 2000), a iako je dobro poznata protu-apoptozna uloga unutarstaničnog Hsp70 (Joly i sur., 2010) postoji svega nekoliko istraživanja koja ukazuju na protu-apoptozna djelovanja eHsp70. Luo i sur. pokazali su da eHsp70 sprječava aktivaciju kaspaze-3 i kaspaze-9 na način ovisan o citokromu c u Schwannovim stanicama (Luo i sur., 2012)), dok su Franco i sur. pokazali da eHsp70 može spriječiti aktivaciju kaspaze-3 induciranu izlaganjem stanica vodikovom peroksidu (Franco i sur., 2016). Točni mehanizmi utjecaja eHsp70 na staničnu smrt još nisu dovoljno poznati te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se oni utvrdili.

### ***5.2.2. rhHsp70 potiskuje citotoksičnost uzrokovanu CSE-om***

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti CSE-a i utjecaja kombinacije CSE-a i rhHsp70 na citotoksičnost pokazali su da niske koncentracije CSE-a (2,5 %) povećavaju metaboličku aktivnost, odnosno vijabilnost NCI-H292 stanica, dok visoke koncentracije CSE-a (15 %) kao i njegove kombinacije s rhHsp70 djeluju citotoksično na ove stanice. 2,5 % CSE uzrokuje značajan poremećaj integriteta stanične membrane i pojačano lučenje LDH, no taj učinak ne zadržava se nakon dodatka rhHsp70 te možemo zaključiti da rhHsp70 djeluje zaštitno potiskujući citotoksičnost CSE-a. U NHBE stanicama kombinacija 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70 uzrokuje značajno povećanje vijabilnosti, a izlučivanje LDH potisnuto je nakon tretiranja CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70. CSE nije značajno utjecao na metaboličku aktivnost THP-1, a kombinacija 2,5 % CSE-a i rhHsp70 uzrokovala je značajan porast vijabilnosti u ovim stanicama. CSE ne uzrokuje značajno lučenje LDH u odnosu na netretirane stanice, no kombinacije 5 % CSE-a i rhHsp70 potiskuju to lučenje. U monocitima CSE djeluje citotoksično, no dodatak 3 µg/ml rhHsp70 uz 2,5 % CSE-a poništava tu citotoksičnost. Iako rhHsp70 ne uspijeva poništiti citotoksičnost 5 % CSE-a, ipak je vijabilnost stanica tretiranih kombinacijama 5 % CSE-a i rhHsp70 značajno viša u odnosu na stanice tretirane samo s 5 % CSE-a. 2,5 % CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 potiskuju lučenje LDH u monocitima, a ovo djelovanje više je izraženo za kombinacije rhHsp70 i 5 % CSE-a. 5 % CSE uzrokuje poremećaj u integritetu stanične membrane i značajno lučenje LDH koje je potisnuto dodatkom rhHsp70. Možemo zaključiti da niske koncentracije CSE-a (2,5 %) uglavnom ne uzrokuju citotoksičnost, dok više koncentracije (15 % u NCI-H292 i 5 % u monocitima) uzrokuju značajnu citotoksičnost te da rhHsp70 djeluje zaštitno i smanjuje citotoksičnost uzrokovanu CSE-om. Naj snažniji citotoksični učinak CSE ima na monocite. Navedeni rezultati u skladu su s prethodno objavljenim istraživanjima. Pokazano je da CSE u niskim koncentracijama izaziva proliferaciju, a u višim koncentracijama i tijekom dužeg

vremena izlaganja stanica izaziva apoptozu u A549 stanicama (Kaushik i sur., 2008) ili uzrokuje značajno otpuštanje LDH (X. Li i sur., 2013). Suprotno tome, Seehase i sur. su na istim A549 stanicama ukazali na citotoksičnost i nižih koncentracija CSE-a (Seehase i sur., 2014). Wu i sur. pokazali su da 2-20 % CSE-a ne uzrokuje značajno otpuštanje LDH u medij iznad stanica u modelu pluća (Wu i sur., 2011). CSE je uzrokovao značajnu citotoksičnost ovisnu o koncentraciji i vremenu izloženosti na stanicama nazalnog epitela (Lan i sur., 2007). Liu i sur. pokazali su da CSE uzrokuje značajnu citotoksičnost i oštećenje DNA u humanim bronhijalnim epitelnim stanicama (Liu i sur., 2008; Kim i sur., 2004). Glader i sur. ispitali su citotoksičnost CSE-a na T limfocitima i plućnim epitelnim stanicama i pokazali da su plućne epitelne stanice značajno rezistentnije na citotoksičnost CSE-a (Glader i sur., 2006). Pokazano je i da CSE djeluje citotoksično na monocite uz četiri puta niže koncentracije od onih primijenjenih na THP-1 stanicama (10 % CSE za monocite i 40 % CSE za THP-1 stanice, ali ove koncentracije nisu jednake CSE-u primijenjenom u ovom istraživanju zbog razlike u pripremi CSE-a) (Brunssen i sur., 2017). Van der Toorn i sur. pokazali su da CSE uzrokuje citotoksičnost na THP-1 stanicama ovisnu o koncentraciji (van der Toorn i sur., 2015).

Što se načina umiranja stanica uz CSE tiče, u ovom je radu opaženo da u NCI-H292 stanicama dolazi do aktivacije mitohondrijskog apoptoznog puta (kaspaza-9) nakon 2 i 8 h tretiranja s 2,5 % CSE-a te uz 2,5 % CSE-a i 1 µg/ml rhHsp70. Put receptora smrti (kaspaza-8) aktiviran je nakon tretiranja s 2,5 % CSE-a i kombinacijom 2,5 % i 15 % CSE-a s 1 µg/ml rhHsp70 nakon 8 h. 2,5 % CSE potiskuje aktivaciju kaspaza-3/7, kao i njegova kombinacija s 1 µg/ml rhHsp70 nakon 8 h tretiranja, dok 15 % CSE uzrokuje aktivaciju kaspaza-3/7 nakon 2 i 8 h tretiranja, a njegove kombinacije s rhHsp70 nakon 2 h. U NHBE stanicama došlo je do aktivacije kaspaza-3/7 nakon tretiranja kombinacijama rhHsp70 s 2,5 i 15 % CSE-a nakon 2 h, dok kaspaze-8 i -9 nisu bile aktivirane. 2,5 % CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 dovode do aktivacije kaspaza-8 i -9 u THP-1 stanicama, dok 5 % CSE potiskuje aktivaciju kaspaze-8. U monocitima je kaspaza-9 značajno aktivirana kombinacijama 5 % CSE-a i rhHsp70 nakon tretiranja 6 h, dok sam 5 % CSE potiskuje aktivaciju ove kaspaze nakon 8 h tretiranja. 2,5 % CSE potiskuje aktivaciju kaspaze-9, dok se dodatkom rhHsp70 aktivnost ove kaspaze vraća na razinu kao u netretiranim stanicama. 5 % CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 značajno su aktivirale kaspaze-3/7. Iz ovih rezultata može se zaključiti da u plućnim epitelnim stanicama s nižim koncentracijama CSE-a dolazi do aktivacije oba apoptozna puta, kombinacije 15 % CSE-a i rhHsp70 aktiviraju put receptora smrti i kaspaze-3/7, dok nakon tretiranja s 2,5 % CSE-a i njegovom kombinacijom s rhHsp70 dolazi do potiskivanja

aktivnosti izvršnih kaspaza-3/7. U NHBE stanicama je u ispitivanim uvjetima došlo samo do aktivacije izvršnih kaspaza-3/7 nakon tretiranja kombinacijama 2,5 i 15 % CSE-a s rhHsp70, pa možemo pretpostaviti da vjerojatno dolazi do aktivacije barem jednog od apoptoznih putova u ranijim vremenskim točkama od onih koje su ispitivane u ovom istraživanju i koje bi trebalo ispitati u budućnosti. U THP-1 stanicama monocitno-makrofagnog sustava aktivirana su oba apoptozna puta s 2,5 % CSE-a, dok 5 % CSE potiskuje put receptora smrti i uzrokuje aktivaciju izvršnih kaspaza-3/7. U monocitima aktiviran je samo mitohondrijski apoptozni put nakon tretiranja s 5 % CSE-a i rhHsp70, dok sam 2,5 % CSE potiskuje ovu aktivaciju. Dosadašnja istraživanja pokazala su da način umiranja stanica uzrokovan dimom cigareta ovisi o vrsti stanica, koncentraciji CSE-a i vremenu primijene. Stoga su na različitim staničnim linijama (A549, BEAS-2B i Jurkat stanice) dobiveni oprečni rezultati, pri čemu je CSE ponekad uzrokovao nekrozu, a ponekad apoptozu s ili bez aktivacije kaspaza (Kim i sur., 2008; Slebos i sur., 2007; Jiao i sur., 2006; Ramage i sur., 2006; Wickenden i sur., 2003; Hoshino i sur., 2001). Dim cigareta djeluje različito i na primarne stanice. Pokazano je da niske koncentracije CSE-a izazivaju apoptozu plućnih fibroblasta aktivacijom kaspaza preko receptora smrti, a više koncentracije i dulje izlaganje nekrozu (Ryter i sur., 2010), dok je u HUVEC stanicama umbilikalne vene dim cigareta inhibirao aktivaciju kaspaza i izazvao nekrozu (Wickenden i sur., 2003). Bucchieri i sur. opazili su da 20 % CSE uzrokuje apoptozu u PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s astmom, ali u ovom slučaju apoptoza nije bila ovisna o kaspazama-3 i -9 (Bucchieri i sur., 2015), a Ahmed i sur. da 15 i 20 % CSE-a uzrokuju aktivaciju kaspaze-3 u fetalnim stanicama pluća štakora (Ahmed i sur., 2013). Teramoto i sur. pokazali su da CSE izaziva apoptozu ili nekrozu u neutrofilima bolesnika s KOPB-om ovisno o koncentraciji (Teramoto i sur., 2005). U ovom je radu primjena rhHsp70 zajedno s CSE-om uglavnom povećala aktivnost kaspaza u odnosu na aktivnost uzrokovanu samim CSE-om. Iako su neka istraživanja pokazala da eHsp70 djeluje protu-apoptozno (Franco et al. 2016), moguće je da u NCI-H292 i THP-1 stanicama te u monocitima ipak dolazi do aktivacije apoptozne mašinerije, tj. do „skretanja“ u način umiranja stanica apoptozom, a ne nekrozom. Za razjašnjenje ovih pitanja trebali bi se primijeniti specifičniji testovi i metode kojima bi se mogao utvrditi udio stanica u apoptozi i/ili nekrozi.



### 5.3. Mehanizmi djelovanja rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a

Mehanizmi djelovanja rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na staničnim modelima KOPB-a istraženi su ispitivanjem ekspresije TLR2 i TLR4 receptora te unutarstaničnog Hsp70, kao i aktivacije MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova.

#### 5.3.1. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora

Smatra se da eHsp70 može aktivirati stanice imunosnog sustava na način da se vežu na TLR2 i TLR4 receptore, koji onda potiču MyD88/IRAK/NF- $\kappa$ B i MAPK signalne putove, što u konačnici dovodi do pojačane sinteze upalnih citokina (Ferat-Osorio i sur., 2014; Murshid i sur., 2011; Thériault i sur., 2005). TLR2 i TLR4 receptori eksprimirani su na epitelnim stanicama dišnih putova, alveolarnim makrofagima te na monocitima i neutrofilima (Zuo i sur., 2015; Lafferty i sur., 2010).

U ovom istraživanju rhHsp70 i 15 % CSE značajno su potaknuli ekspresiju mRNA za TLR2 i TLR4 receptore u NCI-H292 stanicama nakon 24 sata. Učinak rhHsp70 bio je slabiji od učinka 15 % CSE-a te je pojačao ekspresiju TLR2 za 60 % i TLR4 za 75 %, dok je CSE povećao ekspresiju TLR2 tri puta, a TLR4 pet puta u odnosu na netretirane stanice. Ekspresija proteina TLR2 i TLR4 Western blot metodom određivana je nakon kraćeg vremena tretiranja NCI-H292 stanica i tu je došlo do sniženja ekspresije TLR2 nakon tretiranja s 2,5 % CSE-a te njegovim kombinacijama s rhHsp70, dok je TLR4 receptor imao značajno povišenu ekspresiju nakon tretiranja s rhHsp70, LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama tijekom 8 h. Zanimljivo je da su od primarnih plućnih epitelih stanica značajne promjene u ekspresiji TLR2 i TLR4 receptora detektirane samo na razini mRNA u PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om gdje su i rhHsp70 i CSE značajno snizili ekspresiju mRNA za TLR2 i TLR4 receptore, sa snažnijim djelovanjem na TLR2, što ukazuje na povezanost s KOPB-om. U stanicama monocitno-makrofagnog sustava 2,5 % CSE povećao je ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora u THP-1 stanicama, dok je 5 % CSE smanjio ekspresiju TLR2, a 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 TLR4, u THP-1 stanicama i u monocitima. 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 povećao je ekspresiju mRNA za TLR2 u monocitima za oko 6 puta, dok je 2,5 % CSE smanjio ekspresiju mRNA za TLR2 na oko 30 % u odnosu na netretirane monocite. Na razini proteina 2,5 % CSE smanjio je ekspresiju TLR2 u THP-1 stanicama nakon 2 h tretiranja, dok se ekspresija TLR2 uz dodatak CSE-a i rhHsp70 vratila na razinu netretiranih stanica u istoj vremenskoj točki. U monocitima je na razini proteina došlo do vidljivih promjena samo nakon 30 minuta tretiranja; do

povećanja ekspresije TLR2 došlo je uz 10 µg/ml rhHsp70, 2,5 i 5 % CSE i LPS, a do povećanja ekspresije TLR4 uz 10 µg/ml rhHsp70 i 5 % CSE.

Iz ovih rezultata može se zaključiti da viša koncentracija CSE-a u NCI-H292 stanicama inducira ekspresiju mRNA za TLR2 i TLR4 nakon dužeg vremena tretiranja, dok se na razini proteina ne vide promjene u kraćim vremenima. S druge strane, niža koncentracija CSE-a pokazuje samo promjene na razini proteina za TLR2 (smanjuju njegovu koncentraciju) nakon kratkog vremena tretiranja. Sam rhHsp70 potiče značajnu ekspresiju mRNA za TLR2 i TLR4 nakon 24 h u NCI-H292 stanicama, dok su na razini proteina vidljive promjene u smislu povećane ekspresije TLR4 uz rhHsp70, LPS, LTA i njihove kombinacije već nakon tretiranja tijekom 30 minuta. U PBEC stanicama postoje značajne razlike u ekspresiji mRNA za TLR2 i TLR4 između stanica izoliranih od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om te su samo stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om značajno reagirale na stimulaciju s rhHsp70 ili CSE-om smanjenjem ekspresije mRNA za TLR2 i TLR4. 2,5 % CSE značajno povećava ekspresiju mRNA za TLR2 i TLR4 u THP-1 stanicama, što nije slučaj s monocitima gdje 2,5 % CSE-a snizuje ekspresiju mRNA za TLR2 receptor. 10 µg/ml rhHsp70 ima jednak učinak na TLR4 receptor THP-1 stanica i monocita te snizuje ekspresiju mRNA za ovaj receptor, dok rhHsp70 povećava ekspresiju mRNA za TLR2 u monocitima, ali ne i u THP-1 stanicama. Na razini proteina 2,5 % CSE snizuje ekspresiju TLR2 nakon 2 h u THP-1 stanicama, a to sniženje se gubi uz rhHsp70. U monocitima CSE, rhHsp70 i LPS povećavaju ekspresiju TLR2 proteina, a CSE i rhHsp70 TLR4 proteina.

U literaturi ne postoji mnogo podataka o ekspresiji TLR2 ili TLR4 receptora nakon izravnog djelovanja eHsp70, no u nekoliko istraživanja pronađeno je da on može inducirati ekspresiju ovih receptora (Dybdahl i sur., 2005; Asea i sur., 2002; Vabulas i sur., 2002). S druge strane, postoje različiti podaci o utjecaju CSE-a na TLR receptore. Izloženost dimu cigareta aktivira TLR4 u mišjim i ljudskim stanicama na način da sastojci dima cigareta izravno djeluju na TLR4 i aktiviraju ga ili djeluju neizravno uzrokujući oštećenje epitelnih stanica i otpuštanje DAMP molekula koje se onda vežu na TLR4 (Opitz i sur., 2010). Utvrđena je korelacija između izloženosti dimu cigareta, ekspresije TLR4 i TLR9 receptora te sinteze citokina, osobito IL-8 (Zuo i sur., 2015; Freeman i sur., 2013; Nadigel i sur., 2013; Bezemer i sur., 2012; Nadigel i sur., 2011). CSE je u stanicama koštane srži povišio ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora unutar stanice i na površini (Zhou i sur., 2011). Mortaz i sur. opazili su povišenu ekspresiju ukupnog TLR4 u 16HBE stanicama, no sniženu ekspresiju ovog receptora na površini istih stanica te smatraju da bi uzrok tome mogao biti internalizacija TLR4 receptora uzrokovana CSE-om (Mortaz i sur., 2011). Također je pokazano da CSE može utjecati na

ekspresiju TLR4 u BEAS-2B stanicama tako da se poveća sinteza ovog receptora (Pace i sur., 2008), a na makrofagima tako da se povećaju unutarstanične koncentracije, a smanji se ekspresija TLR4 na površini stanica (Sarir i sur., 2009). MacRedmond i sur. pokazali su da CSE snižava ekspresiju mRNA za TLR4 i ekspresiju TLR4 proteina u A549 stanicama, dok je ekspresija TLR2 ostala nepromijenjena (MacRedmond i sur., 2007). Ekspresija TLR2 povišena je u monocitima bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave nepušače i pušače (Pons i sur., 2006). U alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om i zdravih pušača opažena je snižena ekspresija TLR2 (Droemann i sur., 2005), dok se ekspresija TLR4 u makrofagima i u monocitima nije značajno razlikovala među ispitivanim skupinama (Pons i sur., 2006; Droemann i sur., 2005; Pons i sur., 2005). U makrofagima monocitnoga porijekla kratkotrajno izlaganje CSE-u potisnulo je membransku ekspresiju TLR4 (Sarir i sur., 2009), a ekspresija TLR4 bila je snižena u epitelnim stanicama nosa pušača i bolesnika s težim stadijima KOPB-a u odnosu na zdrave nepušače i bolesnike s blažim stadijima KOPB-a (MacRedmond i sur., 2007). Metcalfe i sur. nisu pronašli razliku u ekspresiji gena za TLR2 ili TLR4 u alveolarnim makrofagima izoliranim od bolesnika s KOPB-om nakon tretiranja CSE-om (Metcalfe i sur., 2014). Comer i sur. pokazali su smanjenu ekspresiju TLR4 receptora nakon tretiranja stanica CSE-om na PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om (Comer i sur., 2014). Poznato je da poremećaj TLR4 receptora doprinosi i razvoju emfizema (An i sur., 2012). Osim toga, TLR receptori značajno su uključeni u egzacerbacije KOPB-a i primarni su medijatori pomoću kojih se aktivira imunosni odgovor na bakterije u dišnim putovima (Zuo i sur., 2015; Oliveira-Nascimento i sur., 2012; Doz i sur., 2008).

U ovom istraživanju odgovor TLR2 i TLR4 na LPS, LTA i njihove kombinacije određivan je samo Western blot metodom, kojom je opaženo jedino povećanje ekspresije TLR4 u NCI-H292 stanicama, no moguće je da bi se odabirom drugih metoda i/ili vremenskih točaka uspjelo detektirati puno više razlika u ekspresiji ovih receptora i to bi bilo vrijedno istražiti u budućnosti. Bolesnici s KOPB-om imaju povećanu ekspresiju TLR1 i TLR2 na T limfocitima što može doprinijeti oštećenju pluća i razaranju alveola, a također je otkriveno da je ekspresija TLR4 inducirana LPS-om snižena u limfocitima pušača s ili bez KOPB-a (Zuo i sur., 2015). Smanjeno djelovanje TLR receptora može značajno doprinijeti egzacerbacijama KOPB-a zbog kompromitirane osjetljivosti na bakterije ili viruse te zbog smanjene sposobnosti fagocitiranja bakterijskih i apoptoznih stanica. S druge strane, povećana aktivacija TLR receptora može uzrokovati neprimjereno pojačanu upalu, što dovodi do oštećenja tkiva (Bezemer i sur., 2014; Bezemer i sur., 2012) te stoga promjene u ekspresiji ili aktivaciji ovih receptora mogu znatno doprinijeti patologiji KOPB-a.

Ipak, možemo zaključiti da je odgovor TLR2 i TLR4 receptora na stimulaciju s rhHsp70, CSE-om, LPS-om ili LTA ovisan o vrsti stanica, koncentraciji agensa te vremenu tretiranja, a također treba naglasiti da su u većini navedenih istraživanja korištene metode različite od qPCR-a i Western blota te da je ograničenje našeg istraživanja mali broj istovjetnih uzoraka (n=3), no uočene promjene u ekspresiji ovih receptora mogle bi imati važnu ulogu u patogenezi bolesti.

### ***5.3.2. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na aktivaciju i ekspresiju MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova***

Budući da se signalizacija potaknuta izvanstaničnim Hsp70 odvija preko NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih putova (Ferat-Osorio i sur., 2014; Thériault i sur., 2005), u ovom su radu ispitane aktivacija i ekspresija MAP kinaza i I $\kappa$ B $\alpha$  nakon tretiranja s rhHsp70, LPS-om, LTA i CSE-om.

Aktivacija MAPK signalnih putova odgovor je stanice na stresni podražaj, a može dovesti do proliferacije stanica, diferencijacije, smrti ili upalnog odgovora (Rumora i Žanić Grubišić, 2008; Roux i Blenis, 2004). NF- $\kappa$ B pripada porodici transkripcijskih faktora koji reguliraju različite stanične procese kao što su upala, aktivacija imunosnog sustava, proliferacija stanica i apoptoza te se u većini stanica nalazi u citoplazmi u neaktivnom obliku vezan za inhibicijski protein I $\kappa$ B. Aktivacija NF- $\kappa$ B odvija se fosforilacijom I $\kappa$ B $\alpha$  na Ser32 i Ser36 nakon koje slijedi degradacija posredovana proteasomom koja rezultira otpuštanjem NF- $\kappa$ B iz kompleksa s inhibitorom te njegovom translokacijom u jezgru stanice (Zhou i sur., 2011; Moynagh, 2005).

U ovom istraživanju rhHsp70 aktivirao je ERK, JNK i p38 MAPK u NCI-H292 stanicama u odnosu na netretirane stanice (ovisno o koncentraciji i vremenu tretiranja), dok je u NHBE stanicama uz rhHsp70 u ispitivanim uvjetima aktivirana samo JNK i c-Jun kinaza od 32-35 kDa čija je aktivnost prethodno opisana u stanicama mozga štakora i leđne moždine zečeva (Shackelford i Yeh, 2006; Shackelford i Yeh, 2001). U THP-1 stanicama u ispitivanim uvjetima rhHsp70 nije aktivirao MAPK, dok su u monocitima s rhHsp70 aktivirane ERK, JNK i p38 MAPK (ovisno o koncentraciji rhHsp70).

Do aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$  u ispitivanim uvjetima je došlo samo u NCI-H292 i THP-1 stanicama. U NCI-H292 stanicama rhHsp70, LPS, LTA i njihove kombinacije s rhHsp70 dovele su do značajne aktivacije u odnosu na netretirane stanice. LPS je imao najjači učinak te su se nakon tretiranja ovom molekulom pojavile dvije vrpce fosforilirane I $\kappa$ B $\alpha$ . U THP-1 stanicama također je došlo do aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$  pod navedenim uvjetima te je i u ovim stanicama najjača

aktivacija bila LPS-om, a na degradaciju I $\kappa$ B $\alpha$  proteina LPS-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 ukazuje smanjena ekspresija ukupne I $\kappa$ B $\alpha$ . Iako u ostalim ispitivanim uvjetima nije došlo do aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$ , ne može se sa sigurnošću tvrditi da ne dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta, budući da se osim fosforilacijom I $\kappa$ B $\alpha$  ovaj signalni put može ispitati na još nekoliko načina, kao što su određivanje aktivacije i ekspresije p65 (RelA) NF- $\kappa$ B, IKK, ispitivanjem promijene u elektroforetskoj pokretljivosti (EMSA, *engl.* electrophoretic mobility shift assay) ili mjerenjem promotorske aktivnosti NF- $\kappa$ B luciferaznim testom.

Na različitim staničnim modelima pokazano je da eHsp70 može aktivirati MAPK i NF- $\kappa$ B signalne putove. Asea i sur. su pokazali da rhHsp70 aktivira promotorsku aktivnost NF- $\kappa$ B u monocitima preko TLR2 i TLR4 receptora i MYD88/IRAK/NF- $\kappa$ B signalnog puta ovisnog o CD-14 (Asea i sur., 2002; Vabulas i sur., 2002). U A549 stanicama, slično kao i u NCI-H292 stanicama, eHsp70 aktivira ERK, JNK, p38 i NF- $\kappa$ B ovisno o vremenu, aktivacija ERK ovisna je o RAGE-u, dok je aktivacija NF- $\kappa$ B ovisna o RAGE-u i ERK-u te autori predlažu ulogu RAGE/ERK/NF- $\kappa$ B signalnih putova u signalizaciji eHsp70 (Somensi i sur., 2017). Na mišjim hepatocitima je pokazano da eHsp70 koristi NF- $\kappa$ B signalne putove, a uz korištenje inhibitora JNK (SP600125) da u upalnom odgovoru na eHsp70 u ovim stanicama bitnu ulogu ima JNK signalni put (Galloway i sur., 2008). Zhe i sur. su pokazali da eHsp70 koristi TLR2/4/JNK1/2/MAPK signalni put u poticanju proliferacije stanica hepatocelularnog karcinoma (Zhe i sur., 2016). U U937 stanicama eHsp70 aktivira upalne procese djelovanjem na NF- $\kappa$ B signalni put (Lee i sur., 2006). Suprotno tome, Luo i sur. su pokazali da eHsp70, ako se dodaje sinovijanim fibroblastima nakon stimulacije s TNF- $\alpha$ , inhibira upalni učinak te aktivaciju MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova (Luo i sur., 2008), dok je u drugom istraživanju na istim stanicama pokazano da eHsp70 može potaknuti prijelaz ovih stanica iz epitelnog u mezenhimalni oblik preko p38 MAPK signalnog puta (H. Li i sur., 2013). eHsp70 aktivira ERK1/2 u ljudskim mezenhimalnim matičnim stanicama i tako potiče osteogenezu (Chen i sur., 2015) a u tumorskim stanicama karcinoma jetre i dojke može aktivirati JNK i NF- $\kappa$ B signalne putove (Juhasz i sur., 2014). eHsp70 također može potisnuti aktivaciju ERK induciranu LPS-om ako se ispitivane stanice predinkubiraju rekombinantnim Hsp70 (Rozhkova i sur., 2011; Saba i sur., 2007). Zhang i sur. su pokazali da, suprotno uvriježenom mišljenju o aktivaciji TLR2/4 signalnih putova ovisnih o MyD88, u mišjim stanicama pluća i endotelnim stanicama eHsp70 djeluje zaštitno naspram oksidacijskog oštećenja, koristeći pri tom signalne putove ovisne o TRIF adaptacijskoj molekuli (Zhang i sur., 2013).

Poznato je da LPS može aktivirati MAPK i NF- $\kappa$ B signalne putove u različitim vrstama stanica uključujući monocite i plućne epitelne stanice (He i sur., 2013; J. Verspohl i Podlogar,

2012; Xing i sur., 2011; Guillot i sur., 2004; Wijayanti i sur., 2004), a sličan učinak ima i LTA (Koch i sur., 2014; Rockel i Hartung, 2012; Hsieh i sur., 2010; Kao i sur., 2005). U ovom istraživanju LPS i njegove kombinacije s rhHsp70 aktivirali su ERK, JNK i p38 MAPK u NCI-H292 i THP-1 stanicama. U NHBE stanicama LPS je aktivirao ERK i JNK (JNK1 i 2 nakon 30 minuta), a c-Jun kinazu od 32-35 kDa nakon 30 minuta, 2 i 8 h, dok je u monocitima aktivirao ERK, JNK i p38 MAPK. Aktivacija MAPK LPS-om bila je uglavnom najснаžnija u odnosu na druge ispitivane agense. LTA je uzrokovala aktivaciju ERK u NCI-H292 stanicama, a njezine kombinacije s rhHsp70 nisu, dok su JNK i p38 aktivirani i s LTA i njezinim kombinacijama s rhHsp70. U NHBE stanicama LTA je aktivirala ERK i JNK (JNK1 i 2 nakon 30 minuta), a c-Jun kinazu od 32-35 kDa nakon 30 minuta, 2 i 8 h. U THP-1 stanicama LTA i njezine kombinacije s rhHsp70 aktivirale su samo p38, a u monocitima je LTA aktivirala ERK, JNK i p38 MAPK. Razlike između aktivacije MAPK i I $\kappa$ B $\alpha$  između stanica tretiranih samo LPS-om ili s LTA u odnosu na njihove kombinacije s rhHsp70 uglavnom nisu uočene. Mogući razlog tome je potreba za osjetljivijom kvantitativnom metodom ili činjenica da su rhHsp70 i LPS ili LTA dodavani istovremeno za razliku od do sada dostupnih literaturnih podataka. Ferat-Osorio i sur. pretpostavili su da je smanjenje lučenja IL-6 nakon tretiranja LPS-om u stanicama pretretiranim s rhHsp70 posljedica inhibicije JNK signalnog puta (Ferat-Osorio i sur., 2014), dok Dokladny i sur. smatraju da do zaštitnog protu-upalnog djelovanja eHsp70 (smanjenje lučenja IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u mišjim makrofagima i A549 stanicama dolazi zbog inhibicije NF- $\kappa$ B signalnog puta (Dokladny i sur., 2010). Nekoliko istraživanja je pokazalo da u upalnoj aktivaciji s eHsp70 i LTA glavnu ulogu ima p38 MAPK te bi ona mogla imati ulogu i u zaštitnim djelovanjima eHsp70 od učinaka izazvanih s LTA (Yurinskaya i sur., 2016; Yurinskaya i sur., 2015; Vinokurov i sur., 2012; Yurinskaya i sur., 2010).

Poznato je da izlaganje dimu cigareta uzrokuje aktivaciju MAPK signalnih putova, a time i različitih transkripcijskih faktora poput NF- $\kappa$ B i AP-1, u epitelnim i endotelnim stanicama dišnih putova te u alveolarnim makrofagima (Manzel i sur., 2011; Park i sur., 2010; Kode i sur., 2008; Pace i sur., 2008; C.-J. Li i sur., 2007; W. Li i sur., 2007; Hoshino i sur., 2005; Kim i sur., 2004). U ovom istraživanju pokazano je da 15 % CSE-a i njegove kombinacije s rhHsp70 uzrokuju aktivaciju ERK i p38 u NCI-H292 stanicama, dok niža koncentracija CSE-a uzrokuje aktivaciju ERK samo u kombinaciji s rhHsp70. U NHBE stanicama 15 % CSE uzrokuje aktivaciju sve tri ispitivane MAPK, dok 2,5 % CSE aktivira c-Jun kinazu od 32-35 kDa. U THP-1 stanicama 5 % CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 uzrokuju značajnu aktivaciju p38, dok su u monocitima CSE-om aktivirane JNK i p38. I $\kappa$ B $\alpha$  nije bio aktiviran u

ispitivanim uvjetima. Može se zaključiti da su u stanicama plućnog epitela aktivirane sve tri ispitivane MAPK (ovisno o koncentraciji), dok u stanicama monocitno-makrofagnog sustava dolazi do aktivacije stresnih kinaza JNK i p38. Prethodna istraživanja pokazala su različite odgovore stanica na izloženost dimu cigareta. U NHBE stanicama tretiranim CSE-om zabilježena je aktivacija ERK1/2 ovisna o koncentraciji te je pokazano da inhibicija MAPK/ERK kinaze (MEK) smanjuje fosforilaciju ERK1/2 i ekspresiju IL-1 $\beta$  inducirane CSE-om (Hellermann i sur., 2002). U NCI-H292 stanicama je pokazano da CSE u niskim koncentracijama aktivira ERK, dok u višim koncentracijama aktivira apoptozne stresne kinaze p38 i JNK (Luppi i sur., 2005). Također je zabilježena i povećana aktivnost p38 u plućnim fibroblastima izloženim CSE-u (Kim i sur., 2011) te aktivacija JNK signalnog puta u HUVEC stanicama umbilikalne vene (Hoshino i sur., 2005). Walters i sur. pokazali su da lučenje IL-8 iz THP-1 stanica inducirano CSE-om ovisi o aktivaciji JNK i NF- $\kappa$ B signalnih putova (Walters i sur., 2005). Zhou i sur. su pokazali da u mononuklearnim stanicama koštane srži CSE uzrokuje aktivaciju ERK i I $\kappa$ B $\alpha$ , ali je aktivacija I $\kappa$ B $\alpha$  neovisna o aktivaciji ERK (Zhou i sur., 2011). U BEAS-2B stanicama, CSE je aktivirao NF- $\kappa$ B signalni put, a njegova farmakološka inhibicija uzrokovala je pojačanu citotoksičnost (Liu i sur., 2008). Suprotno tome, Li i sur. su pokazali da CSE ne aktivira MAPK i ne utječe na otpuštanje IL-8 i GM-CSF-a u primarnim epitelnim stanicama dišnih putova (W. Li i sur., 2007). U ovom istraživanju uglavnom nisu opažene razlike između aktivacije MAPK u stanicama tretiranim samo CSE-om u odnosu na stanice tretiranim njegovim kombinacijama s rhHsp70, osim uz niže koncentracije CSE-a u kombinaciji s rhHsp70 kada je detektirana aktivacija ERK samo pri ovom dvojnomo tretiranju, ali ne i pojedinačnom s CSE-om. Stoga se može zaključiti da kod nižih koncentracija CSE-a rhHsp70 najvjerojatnije djeluje zaštitno i aktivira MAPK kinazu koja ima ulogu u proliferaciji stanica (ERK), što se slaže s rezultatima vijabilnosti pod ovim uvjetima. Suprotno tome, Matsumoto i sur. pronašli su da rekombinantni Hsp70 smanjuje aktivaciju ERK nakon tretiranja CSE-om ili vodikovim peroksidom u stanicama mišjih karotida (Matsumoto i sur., 2008). Li i sur. pronašli su da nakon tretiranja CSE-om plućni fibroblasti otpuštaju Hsp70 u izvanstanični prostor te onda taj eHsp70 potiče lučenje IL-8 putem ovisnim o ERK-u (C.-J. Li i sur., 2007). Metcalfe i sur. pokazali su da u alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om CSE aktivira p38 MAPK, a ako se nakon dodatka CSE-a stanice tretiraju agonistima TLR2, TLR4 i TLR5 receptora značajno je smanjena aktivacija MAPK, NF- $\kappa$ B i lučenje citokina (Metcalfe i sur., 2014).

U istraživanjima aktivacije MAPK kod bolesnika s KOPB-om uočena je povećana aktivacija p38 MAPK u alveolarnim makrofagima i tkivu pluća u pušača oboljelih od KOPB-a u

usporedbi sa zdravim ispitanicima (Gaffey i sur., 2013; Renda i sur., 2008). Mochida-Nishimura i sur. pokazali su je aktivacija p38 kinaze slabija u alveolarnim makrofagima pušača u odnosu na nepušače, dok razlika u razini aktiviranih ERK i JNK nije bilo. Uz to, nakon stimulacije alveolarnih makrofaga LPS-om došlo je do brže aktivacije p38 u pušača nego u nepušača (Mochida-Nishimura i sur., 2001). Rumora i sur. ispitali su aktivaciju MAPK u leukocitima bolesnika s KOPB-om i zdravih kontrola u ovisnosti o pušačkom statusu te je aktivacija ERK opažena kod nepušača, dok je kod pušača i bivših pušača oboljelih od KOPB-a i kod zdravih pušača došlo do aktivacije JNK i p38 (Rumora i sur., 2008).

Aktivacija MAPK kinaza i  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ovisi o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji rhHsp70 ili CSE-a te o trajanju tretiranja. Neka su istraživanja pokazala da pretretiranje rekombinantnim Hsp70 može imati ulogu u smanjenju aktivacije ovih signalnih putova, a u ovom istraživanju se istodobno dodavani rhHsp70 i druge agense. Uz to, korištena Western blot metoda uglavnom nije dovoljno osjetljiva da bi se mogle uočiti manje razlike u aktivaciji ispitivanih signalnih putova pri korištenju pojedinačnih agenasa (LPS-a, LTA ili CSE-a) u odnosu na dvojna tretiranja uz rhHsp70. U daljnjim ispitivanjima individualnih vs. kombiniranih tretiranja trebala bi se primijeniti osjetljivija kvantitativna metoda.

Kako bismo ispitali ulogu aktivacije TLR2 i TLR4 receptora te MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova na upalni odgovor u staničnim modelima KOPB-a, NCI-H292 i THP-1 stanice tretirane su inhibitorima NF- $\kappa$ B, ERK, JNK, p38 te inhibitorima transkripcije i translacije.

U NCI-H292 stanicama, primjena aktinomicina D (inhibitor translacije) potisnula je lučenje IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 uz dodatak rhHsp70, kao i bez rhHsp70, što je očekivani rezultat budući da se ovim inhibitorom onemogućava sinteza proteina. Inhibitori NF- $\kappa$ B (Bay11-7082), p38 MAPK (SB202190) i ERK (PD980059) značajno su potisnuli lučenje IL-6, dok je lučenje IL-8 osim ovih inhibitora potisnuo i inhibitor JNK (SP000126). Inhibitori JNK i p38 pokazuju značajan antagonistički tip učinka s rhHsp70 te iako nisu značajno smanjili lučenje IL-1 $\alpha$  u odnosu na sam rhHsp70, moguće je da ovo upućuje na ulogu JNK i p38 signalnih putova u sintezi i ovog citokina. U THP-1 stanicama inhibitor ERK značajno smanjuje lučenje IL-1 $\beta$  u odnosu na sam rhHsp70, a inhibitori NF- $\kappa$ B i p38 imaju značajan antagonistički tip interakcije s rhHsp70 na lučenje ovog citokina. Lučenje IL-8 uz rhHsp70 u ovim je stanicama inhibirano uz aktinomicin D, dok ostali inhibitori uzrokuju značajno lučenje IL-8 čak i bez dodatka rhHsp70. Ovi rezultati ukazuju na povezanost NF- $\kappa$ B i MAPK signalnih putova u odgovoru na rhHsp70 u NCI-H292 stanicama, a aktivacija pojedinih MAPK ima utjecaj na lučenje različitih citokina. U THP-1 stanicama pokazana je uključenost ERK, p38 i NF- $\kappa$ B na lučenje IL-1 $\beta$ . Ovi rezultati slažu se s prethodnim rezultatima iz literature koji pokazuju da eHsp70



može aktivirati MAPK i NF- $\kappa$ B signalne putove ovisno o vrsti stanica (Somensi i sur., 2017; Zhe i sur., 2016; Galloway i sur., 2008).

### ***5.3.3. Utjecaj rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a na ekspresiju unutarstaničnog Hsp70***

Imunomodulacijska djelovanja Hsp70 proteina mogu biti upalna ili protu-upalna. Unutarstanični Hsp70 može potisnuti upalni proces. Koncentracija Hsp70 u citosolu povećava se ovisno o trajanju i o ukupnoj razini staničnoga stresa te je moguće da je povećana unutarstanična ekspresija Hsp70 povezana sa smanjenim koncentracijama različitih upalnih citokina u krvi. Suprotno tome, eHsp70 djeluje imunostimulirajuće i može doprinijeti patogenezi kroničnih upalnih bolesti. Protu-upalna djelovanja unutarstaničnog Hsp70 su izravna te on potiskuje upalne NF- $\kappa$ B signalne putove, dok eHsp70 djeluje upalno na neizravan način vežući se na transmembranske receptore. Da li će prevladati stimulirajuća (neizravna, posredovana receptorima) ili inhibicijska (izravna, unutarstanična) djelovanja Hsp70 proteina, tj. da li će se ravnoteža pomaknuti prema upalnim ili protu-upalnim odgovorima ovisi o vrsti stanice i o cjelokupnom upalnom kontekstu, kao i o omjeru koncentracija unutarstaničnog i izvanstaničnog Hsp70 (Krause i sur., 2015; Jr i sur., 2011; De Jong i sur., 2009). Stoga je u ovom istraživanju određivana i ekspresiju unutarstaničnog Hsp70. U NCI-H292 stanicama i PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om došlo je do sniženja ekspresije mRNA nakon tretiranja s rhHsp70 ili CSE-om, dok do toga nije došlo u NHBE stanicama i PBEC stanicama izoliranim od zdravih ispitanika. U NHBE stanicama vidljiva je samo promjena ekspresije Hsp70 određena Western blot metodom nakon 8 h tretiranja 15 % CSE-om. U THP-1 stanicama dolazi do sniženja ekspresije mRNA za Hsp70 nakon tretiranja s rhHsp70 i CSE-om, dok je u monocitima ovaj učinak suprotan te dolazi do značajno veće ekspresije u stanicama tretiranim s 10  $\mu$ g/ml rhHsp70 i 5 % CSE-a. Western blot metodom ne vide se razlike u ekspresiju Hsp70 u stanicama monocitno-makrofagnog sustava. Moguće je da je sniženje ekspresije Hsp70 u NCI-H292 i THP-1 stanicama te u PBEC stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om povezano sa svojstvima tumorskih stanica (za NCI-H292 i THP-1 stanice), kao i s povećanim staničnim stresom u KOPB-u (za PBEC KOPB stanice) te dolazi do iscrpljenja i inhibicije sinteze mRNA za Hsp70, dok ovaj učinak u zdravim stanicama izostaje ili one odgovaraju na ove podražaje povećanjem sinteze mRNA za Hsp70. Krause i sur. predlažu da kronična upala koja može biti izazvana s eHsp70 uzrokuje aktivaciju NF- $\kappa$ B koji onda inhibira unutarstanični Hsp70 te dovodi do daljnjeg otpuštanja eHsp70 ili do otpuštanja medijatora oksidacijskog oštećenja stanice. Kad je eHsp70 kronično povišen to može dovesti do upalnog odgovora, inhibicije

aktivacije HSF-1 i sniženog unutarstaničnog Hsp70 (Krause i sur., 2015)). Zanimljivo je da sam inhibitor sinteze Hsp70 (KNK437) gotovo potpuno inhibira lučenje IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 u NCI-H292 stanicama, a inhibira i njihovo lučenje nakon dodatka rhHsp70. U THP-1 stanicama također je inhibirana sinteza citokina (IL-1 $\beta$  i IL-8), ali ne u tolikoj mjeri kao u NCI-H292 stanicama. Nakon tretiranja ovih stanica s KNK437 i rhHsp70 lučenje citokina je inhibirano u odnosu na lučenje nakon tretiranja samim rhHsp70, no ipak je povišeno u odnosu na lučenje citokina nakon dodatka samog KNK437. Cai i sur. su slično ovome pronašli da KNK437 potiskuje sintezu upalnih citokina u mišjim kardiomiocitima (Cai i sur., 2010).

Postoji više istraživanja o utjecaju dima cigareta na ekspresiju Hsp70, ali su dobiveni oprečni rezultati. Zhao i sur. pokazali su da je ekspresija Hsp70 proteina i mRNA za Hsp70 snižena u limfocitima bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima te su zaključili da je smanjena ekspresija Hsp70 u bolesnika s KOPB-om vjerojatno posljedica poremećaja u regulaciji transkripcije gena za Hsp70 (Zhao i sur., 2005). Li i sur. opazili su da ekstrakt dima cigareta inducira Hsp70 u plućnim fibroblastima ovisno o koncentraciji i vremenu (C.-J. Li i sur., 2007). Rumora i sur. ispitivali su ekspresiju Hsp70 i Hsp27 u ovisnosti o pušačkom statusu i pronašli su smanjenu ekspresiju u leukocitima bolesnika s KOPB-om (pušača i bivših pušača) u odnosu na nepušače s KOPB-om te u zdravih pušača u odnosu na bivše pušače i nepušače (L. Rumora i sur., 2008). Dong i sur. su na 16HBE stanicama pokazali povećanje ekspresije Hsp70 nakon tretiranja stanica CSE-om, a ekspresija Hsp70 bila je povišena u stanicama izoliranim od bolesnika s KOPB-om i ovo je povećanje koreliralo s težinom bolesti (Dong i sur., 2013).

#### **5.4. Završna razmatranja**

Ovo je istraživanje pokazalo da sam rhHsp70 može inducirati upalu u stanicama plućnog epitela i monocitno-makrofagnog sustava. Uz to, kada se rhHsp70 dodaje u kombinaciji s bakterijskim komponentama LPS-om i LTA ili ekstraktom dima cigareta opažene su značajne interakcije među njima antagonističkog ili sinergističkog tipa, ovisno o primijenjenoj koncentraciji i o vrsti stanica. Već je prethodno pokazano da eHsp70 može biti povišen kod bolesnika s KOPB-om, a oni su podložni bakterijskim kolonizacijama i infekcijama, dok je pušenje jedan od glavnih čimbenika rizika za nastanak KOPB-a. Međusobne interakcije eHsp70 s LTA, LPS-om ili dimom cigareta složene su, a njihova istovremena prisutnost može uzrokovati smanjeno djelovanje ili pojačanu aktivaciju TLR2 i TLR4 receptora, što može

dovesti do pogoršanja upale, a time i do nepovoljnih posljedica za bolesnike s KOPB-om. Rezultati ovog rada pridonose boljem poznavanju ovih kompleksnih odnosa, no izazov je za budućnost ispitati ulogu eHsp70 u *ex vivo* uvjetima u krvi bolesnika s KOPB-om i povezati ga sa sistemskim upalnim fenotipom te primijeniti ove rezultate za potencijalne nove dijagnostičke, prognostičke i/ili terapijske svrhe.

## **6. ZAKLJUČCI**

## **Rezultati ovog istraživanja pokazali su:**

### **1. rhHsp70 potiče upalni odgovor (izlučivanje citokina) ovisan o vrsti stanica i koncentraciji:**

- IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 u NCI-H292, IL-6 i IL-8 u PBEC i PBEC KOPB, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-8 u THP-1 stanicama i IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u monocitima
- suprotno tome u PBEC i PBEC KOPB stanicama rhHsp70 potiskuje lučenje IL-1 $\alpha$
- najsnažniji upalni odgovor na rhHsp70 od primarnih stanica plućnog epitela na stimulaciju rhHsp70 daju PBEC stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om

### **2. rhHsp70 modulira upalni odgovor na LPS i LTA ovisno o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji i određivanom citokinu:**

- LPS i rhHsp70 uglavnom nemaju značajne međusobne interakcije, a ako one postoje uglavnom su sinergističkog tipa; interakcije između rhHsp70 i LTA uglavnom su antagonističkog tipa
- ove interakcije najsnažnije su izražene u stanicama monocitno-makrofagnog sustava, dok uglavnom nisu prisutne u plućnim epitelnim stanicama izoliranim od zdravih ispitanika
- upalni odgovor na sam LPS ili LTA ovisi o vrsti stanica, a jači je u stanicama monocitno-makrofagnog sustava u odnosu na plućne epitelne stanice; u NHBE stanicama dolazi do najsnažnijeg lučenja IL-6, dok PBEC stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om luče najviše IL-1 $\alpha$  i IL-8

### **3. rhHsp70 modulira upalni odgovor izazvan CSE-om ovisno o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji i citokinu:**

- CSE potiče lučenje IL-1 $\alpha$ , IL-6 i IL-8 u NCI-H292, IL-6 i IL-8 u NHBE, PBEC i PBEC KOPB stanicama te IL-8 u THP-1 stanicama i monocitima; lučenje IL-1 $\alpha$  je potisnuto u PBEC i PBEC KOPB stanicama u odnosu na netretirane stanice
- nakon tretiranja CSE-om koncentracije IL-6 i IL-8 izlučene iz PBEC stanica izoliranih od zdravih ispitanika značajno su niže od onih izlučenih iz PBEC stanica od bolesnika s KOPB-om i NHBE stanica.
- rhHsp70 i CSE imaju antagonistički tip interakcija na lučenje citokina koji je više izražen u stanicama plućnog epitela nego na stanicama monocitno-makrofagnog sustava uz primijenu niže koncentracije CSE-a (2,5 %)

### **4. rhHsp70 djeluje zaštitno naspram citotoksičnosti LPS-a i LTA:**

- sam rhHsp70 uglavnom ne djeluje citotoksično

- LPS, LTA i njihove kombinacije s rhHsp70 ne utječu značajno na metaboličku aktivnost NCI-H292 i NHBE stanica, dok LPS značajno smanjuje metaboličku aktivnost THP-1 stanica
- rhHsp70 uglavnom djeluje zaštitno tj. pomaže očuvanju integriteta stanične membrane (smanjuje aktivnost LDH izlučene u medij iznad stanica) ukoliko se kombinira s LPS-om ili LTA, no ovaj učinak ovisi o vrsti stanica i koncentraciji te je više izražen na staničnim linijama NCI-H292 i THP-1
- rhHsp70 ima ulogu i u potiskivanju aktivnosti kaspaza, naročito kaspaze-3/7 te stoga djeluje zaštitno i sprječava aktivaciju apoptoznog programa koji potiču LPS ili LTA, no ovaj učinak ovisi o primijenjenim koncentracijama, vremenima i vrsti stanica

#### **5. rhHsp70 djeluje zaštitno naspram citotoksičnosti CSE-a:**

- CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 su u nižim koncentracijama uzrokovali proliferaciju NCI-H292, THP-1 i NHBE stanicama, dok sam CSE u višim koncentracijama djeluje citotoksično
- rhHsp70 potiskuje lučenje LDH iz NCI-H292, NHBE, THP-1 stanica i monocita uzrokovano CSE-om
- najsnažnije citotoksično djelovanje CSE-a i njegovih kombinacija s rhHsp70 pokazano je na monocitima.
- u plućnim epitelnim stanicama uz niže koncentracije CSE-a dolazi do aktivacije oba apoptozna puta, dok se uz kombinaciju s rhHsp70 potiskuje aktivacija kaspaze-3/7, ovisno o koncentraciji i vremenu
- u stanicama monocitno-makrofagnog sustava kombinacije rhHsp70 s CSE-om uglavnom jače aktiviraju kaspaze od samog CSE-a

#### **6. rhHsp70 utječe na ekspresiju i aktivaciju TLR2 i TLR4 ovisno o vrsti stanica i primijenjenoj koncentraciji:**

- od primarnih plućnih epitelnih stanica samo su stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om značajno reagirale na stimulaciju s rhHsp70 ili CSE-om smanjenjem ekspresije mRNA za TLR2 i TLR4
- u NCI-H292 stanicama ekspresija mRNA za TLR2 i TLR4 povećana je nakon tretiranja s rhHsp70
- u stanicama monocitno-makrofagnog sustava utjecaj rhHsp70 i CSE-a na ekspresiju mRNA za TLR2 i TLR4 ovisi o primijenjenoj koncentraciji

- ekspresija TLR2 i TLR4 na razini proteina u stanicama tretiranim s rhHsp70, LPS-om, LTA, CSE-om i njihovim kombinacijama ovisna je o vrsti stanica te koncentraciji i vremenu tretiranja

#### **7. rhHsp70, LPS, LTA i CSE utječu na ekspresiju unutarstaničnog Hsp70:**

- od primarnih plućnih epitelnih stanica samo su stanice izolirane od bolesnika s KOPB-om značajno reagirale na stimulaciju s rhHsp70 ili CSE-om smanjenjem ekspresije mRNA za Hsp70; isto se događa i u NCI-H292 stanicama
- ekspresija mRNA za Hsp70 u stanicama monocitno-makrofagnog sustava tretiranim s rhHsp70 ili CSE-om ovisi o vremenu i koncentraciji

#### **8. rhHsp70, LPS, LTA, CSE i njihove kombinacije aktiviraju MAPK i NF- $\kappa$ B signalne putove ovisno o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji i vremenu tretiranja:**

- rhHsp70 uzrokuje aktivaciju ERK, JNK i p38 MAPK u NCI-H292 stanicama (ovisno o koncentraciji i vremenu tretiranja), dok je u NHBE stanicama uz rhHsp70 u ispitivanim uvjetima aktivirana samo JNK i c-Jun kinaza od 32-35 kDa
- u THP-1 stanicama rhHsp70 nije aktivirao MAPK, dok su u monocitima s rhHsp70 aktivirane ERK, JNK i p38 MAPK (ovisno o koncentraciji rhHsp70)
- LPS, LTA i njihove kombinacije s rhHsp70 uzrokuju aktivaciju ERK, JNK i p38 MAPK u NCI-H292 i THP-1 stanicama (ovisno o koncentraciji i vremenu)
- CSE i njegove kombinacije s rhHsp70 uzrokuju aktivaciju ERK i p38 MAPK u NCI-H292 stanicama i p38 MAPK u THP-1 stanicama
- LPS, LTA i CSE aktiviraju MAPK u NHBE stanicama i monocitima ovisno o primijenjenoj koncentraciji i vremenu
- do aktivacije I $\kappa$ B $\alpha$  u ispitivanim uvjetima je došlo samo u NCI-H292 i THP-1 stanicama nakon tretiranja s rhHsp70, LPS-om, LTA i njihovim kombinacijama; LPS je imao najsnažniji učinak
- potiskivanje lučenja IL-6 u NCI-H292 stanicama nakon pretretiranja inhibitorima NF- $\kappa$ B (Bay11-7082), ERK (PD980059) i p38 MAPK (SB202190) ukazuje na ulogu ovih signalnih putova u sintezi IL-6 potaknutoj rhHsp70, dok je u sintezi IL-8 uključen još i JNK signalni put, a u sintezi IL-1 $\alpha$  JNK i p38 MAPK signalni putovi
- u THP-1 stanicama pokazana je uloga ERK, p38 i NF- $\kappa$ B signalnih putova u sintezi i lučenju IL-1 $\beta$

## **7. POPIS LITERATURE**



- Abboud PA, Lahni PM, Page K, Giuliano JS, Harmon K, Dunsmore KE, Wong HR, Wheeler DS. The role of endogenously produced extracellular HSP72 in mononuclear cell reprogramming. *Shock*, 2008, 30, 285–292.
- Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12, 361–367.
- Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papan A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis *J Glob Health*, 2015, 5
- Agusti A. Systemic effects of COPD: Just the tip of the iceberg *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2008, 5, 205–206.
- Agusti A. The path to personalised medicine in COPD *Thorax*, 2014, 0, 1–8.
- Agusti A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Yates JC, Vestbo J. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort *Respir Res*, 2010, 11, 122.
- Agusti A, Edwards LD, Celli B, MacNee W, Calverley PMA, Millerova H, Lomas DA, Wouters E, Bakke P, Rennard S, Crim C, Miller BE, Coxson HO, Yates JC, Tal-Singer R, Vestbo J. Characteristics, stability and outcomes of the 2011 GOLD COPD groups in the ECLIPSE cohort *Eur Respir J*, 2013, 42, 636–646.
- Agusti A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, Vestbo J, Lomas DA, Calverley PMA, Wouters E, Crim C, Yates JC, Silverman EK, Coxson HO, Bakke P, Mayer RJ, Celli B. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in copd: A novel phenotype *PLoS One*, 2012, 7
- Agusti A, MacNee W. The COPD control panel: towards personalised medicine in COPD. *Thorax*, 2013, 68, 687–690.
- Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax*, 2003, 58, 832–834.

- Agusti A, Sin DD. Biomarkers in COPD *Clin Chest Med*, 2014, 35, 131–141.
- Agusti À, Soriano JB. COPD as a systemic disease *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2008, 5, 133–138.
- Agusti AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease *Eur Respir J*, 2003, 21, 347–360.
- Ahmed A, Thliveris JA, Shaw A, Sowa M, Gilchrist J, Scott JE. Caspase 3 activity in isolated fetal rat lung fibroblasts and rat periodontal ligament fibroblasts: cigarette smoke induced alterations *Tob Induc Dis*, 2013, 11, 25.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling *Nat Rev Immunol*, 2004, 4, 499–511.
- Alexopoulou L, Holt a C, Medzhitov R, Flavell R a. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, 413, 732–738.
- An CH, Wang XM, Lam HC, Ifedigbo E, Washko GR, Ryter SW, Choi AMK. TLR4 deficiency promotes autophagy during cigarette smoke-induced pulmonary emphysema *AJP Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303, L748–L757.
- Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells *J Immunol*, 2006, 177, 7184–7192.
- Asea a, Kraeft SK, Kurt-Jones E a, Stevenson M a, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 2000, 6, 435–442.
- Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, Calderwood SK. HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5, 425–431.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch J a, Baré O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70 *J Biol Chem*, 2002, 277, 15028–15034.
- Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lötval J, Sakalauskas R, Sitkauskienė B. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD

*Respir Res*, 2007, 8, 81.

Bafadhel M, Clark TW, Reid C, Medina MJ, Batham S, Barer MR, Nicholson KG, Brightling CE. Procalcitonin and C-reactive protein in hospitalized adult patients with community-acquired pneumonia or exacerbation of asthma or COPD *Chest*, 2011, 139, 1410–1418.

Baglolle CJ, Sime PJ, Phipps RP. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295, L624–L636.

Bangen JM, Schade FU, Flohé SB. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359, 709–715.

Barišić K. Heat shock proteins and immunityU: Biochemistry and immunology intersections. Markotić A, urednik, Trivandrum, Research Signpost, 2008, str. 29–36.

Barišić K, Galović Rengel R, Žanić Grubišić T. Stresni proteini i njihov klinički značaj *Biochem Medica*, 2003, 3, 101–107.

Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14, 511–522.

Barnes PJ. Alveolar Macrophages as Orchestrators of COPD *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2004, 1, 59–70.

Barnes PJ. Review series The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease *J Clin Invest*, 2008, 118, 3546–3556.

Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41, 631–638.

Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease *Clin Chest Med*, 2014, 35, 71–86.

Becker S, Dailey L, Soukup JM, Silbajoris R, Devlin RB. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203, 45–52.

- Bezemer G, Jubinville E, Mortaz E, Kraneveld A, Garssen J, Duchaine C, Folkerts G. Microbes and microbial products in cigarette smoke. Implications for chronic obstructive pulmonary disease *AnnAmThoracSoc*, 2014, 11 Suppl 1, S76.
- Bezemer GFG, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, Folkerts G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 2012, 64, 337–358.
- Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*, 2000, 55, 114–120.
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger *J Leukoc Biol*, 2006, 81, 1–5.
- Borges TJ, Wieten L, Van Herwijnen MJC, Broere F, Van derZee R, Bonorino C, Van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70 *Front Immunol*, 2012, 3
- Borthwick LA. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung *Semin Immunopathol*, 2016, 38, 517–534.
- Botelho FM, Bauer CMT, Finch D, Nikota JK, Zavitz CCJ, Kelly A, Lambert KN, Piper S, Foster ML, Goldring JJP, Wedzicha JA, Bassett J, Bramson J, Iwakura Y, Sleeman M, Kolbeck R, Coyle AJ, Humbles AA, Stämpfli MR. IL-1 $\alpha$ /IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice *PLoS One*, 2011, 6
- Bourgeois JS, Jacob J, Garewal A, Ndahayo R, Paxson J. The bioavailability of soluble cigarette smoke extract is reduced through interactions with cells and affects the cellular response to CSE exposure *PLoS One*, 2016, 11
- Brashier BB, Kodgule R. Risk factors and pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Assoc Physicians India*, 2012, 60 Suppl, 17–21.
- Brieger A, Rink L, Haase H. Differential Regulation of TLR-Dependent MyD88 and TRIF Signaling Pathways by Free Zinc Ions *J Immunol*, 2013, 191, 1808–1817.
- Broekman W, Amatngalim GD, de Mooij-Eijk Y, Oostendorp J, Roelofs H, Taube C, Stolk J,

- Hiemstra PS. TNF-alpha and IL-1beta-activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor *Respir Res*, 2016, 17, 3.
- Brunssen C, Giebe S, Hofman A, Brux M, Morawietz H. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative, and Pro-Inflammatory Effects of Aqueous Cigarette Smoke Extract on Human Monocytes: A Potential Model System for Assessment of Next-Generation Tobacco and Nicotine Products *Appl Vitro Toxicol*, 2017, 1, 121–130.
- Bucchieri F, Marino Gammazza A, Pitruzzella A, Fucarino A, Farina F, Howarth P, Holgate ST, Zummo G, Davies DE. Cigarette smoke causes caspase-independent apoptosis of bronchial epithelial cells from asthmatic donors *PLoS One*, 2015, 10
- Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD *Respir Med*, 2003, 97, 1299–1302.
- Cai W-F, Zhang X-W, Yan H-M, Ma Y-G, Wang X-X, Yan J, Xin B-M, Lv X-X, Wang Q-Q, Wang Z-Y, Yang H-Z, Hu Z-W. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc Res*, 2010, 88, 140–149.
- Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, Zuin R, Marulli G, Baraldo S, Saetta M, Valente M. Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res*, 2005, 6, 14.
- Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition in the treatment of COPD *Int J COPD*, 2014, 9, 397–412.
- Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact*, 2006, 5, 13.
- Carta S, Castellani P, Delfino L, Tassi S, Vene R, Rubartelli A. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes *J Leukoc Biol*, 2009, 86, 549–555.
- Cavaillès A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S, Meurice J-C, Morel H, Person-Tacnet C, Leroyer C, Diot P, Rogliani P, Lauro D,

Novelli L, Page C, Ehrlich S, Quesenberry C, Eeden S, Shan J, Ferrara A, Walter R, Beiser A, Givelber R, O'Connor G, Gottlieb D, Lange P, Groth S, Kastrup J, Mortensen J, Appleyard M, Nyboe J, Davis W, Knuiman M, Kendall P, Grange V, Davis T, Fremantle D, Rogliani P, Calzetta L, Segreti A, Barrile A, Cazzola M, Cazzola M, Bettoncelli G, Sessa E, Cricelli C, Biscione G, Lee C, Mao I, Lin C, Lin S, Hsieh M, Joo H, Park J, Lee S, Oh Y, Wells C, Baker E, Lange P, Groth S, Mortensen J, Appleyard M, Nyboe J, Schnohr P, Lazarus R, Sparrow D, Weiss S, Engstrom G, Janzon L, Rana J, Mittleman M, Sheikh J, Hu F, Manson J, Colditz G, Kwon C, Rhee E, Song J, Kim J, Kwag H, Sung K, Song Y, Klevak A, Manson J, Buring J, Liu S, Hersh C, Make B, Lynch D, Barr R, Bowler R, Calverley P, Oksanen T, Kivimaki M, Pentti J, Virtanen M, Klaukka T, Vahtera J, Agusti A, Calverley P, Celli B, Coxson H, Edwards L, Lomas D, Feary J, Rodrigues L, Smith C, Hubbard R, Gibson J, MacNee W, Miller J, Edwards L, Agusti A, Bakke P, Calverley P, Celli B, Mirrakhimov A, Wedzicha J, Seemungal T, MacCallum P, Paul E, Donaldson G, Bhowmik A, Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano J, Munoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, Karadag F, Kirdar S, Karul A, Ceylan E, Gan W, Man S, Senthilselvan A, Sin D, Franciosi L, Page C, Celli B, Cazzola M, Walker M, Danhof M, Cazzola M, Matera M, Rogliani P, Page C, Agusti A, Faner R, Anderson D, Macnee W, Garcia P, Sood A, Chung K, Adcock I, Buist A, McBurnie M, Vollmer W, Gillespie S, Burney P, Mannino D, Manson J, Ajani U, Liu S, Nathan D, Hennekens C, MacNee W, Evans J, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G, Tiengo A, Fadini G, Avogaro A, Ge R, Simonson T, Cooksey R, Tanna U, Qin G, Huff C, Sauerwein H, Schols A, Gamboa J, Garcia-Cazarin M, Andrade F, Pallayova M, Lazurova I, Donic V, Jakobsson P, Jorfeldt L, Jakobsson P, Jorfeldt L, Schenck H, Semenza G, Niedowicz D, Daleke D, Pogson Z, McKeever T, Fogarty A, Yeh H, Punjabi N, Wang N, Pankow J, Duncan B, Brancati F, Yeh H, Punjabi N, Wang N, Pankow J, Duncan B, Cox C, Fernandes L, Henry P, Goldie R, Slatore C, Bryson C, Au D, Walters J, Gibson P, Wood-Baker R, Hannay M, Walters E, Walters J, Walters E, Wood-Baker R, Faul J, Wilson S, Chu J, Canfield J, Kuschner W, O'Byrne P, Rennard S, Gerstein H, Radner F, Peterson S, Lindberg B, Matera M, Cardaci V, Cazzola M, Rogliani P, Fabbri L, Calverley P, Izquierdo-Alonso J, Bundschuh D, Brose M, Martinez F, Wouters E, Bredenbroeker D, Teichmann P, Brose M, Rabe K, Fabbri L, Kesten S, Jara M, Wentworth C, Lanes S, American D, Holman R, Paul S, Bethel M, Matthews D, Neil H, Salpeter S, Greyber E, Pasternak G, Salpeter E, Hitchings A, Archer J, Srivastava S, Baker E, Huang N, Chiang S, Hsueh C, Liang Y, Chen Y, Lai L, Formoso G, Filippis E, Michetti N, Fulvio P,

Pandolfi A, Bucciarelli T, Garnett J, Baker E, Naik S, Lindsay J, Knight G, Gill S, Kim H, Lee J, Jung H, Kim D, Lee S, Yim J, Sexton P, Metcalf P, Kolbe J, Guazzi M, Oreglia I, Guazzi M, Chance W, Rhee C, Yilmaz C, Dane D, Pruneda M, Raskin P, Ceglia L, Lau J, Pittas A, Hotamisligil G, Mancuso P, Broekhuizen R, Vernooij J, Schols A, Dentener M, Wouters E, Bruno A, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Giammanco S, Gjomarkaj M, Yang Y, Sun T, Liu X, Kythreotis P, Kokkini A, Avgeropoulou S, Hadjioannou A, Anastasakou E, Rasidakis A, Miller M, Cho J, Pham A, Ramsdell J, Broide D, Yoon H, Li Y, Man S, Tashkin D, Wise R, Connett J, Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, Bratel T, Wennlund A, Carlstrom K, Kalupahana N, Moustaid-Moussa N, Karin M, Yamamoto Y, Wang Q, Agusti A, Morla M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. Comorbidities of COPD *Eur Respir Rev*, 2013, 22, 454–475.

Cavalcante AGDM, de Bruin PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives *J Bras Pneumol*, 2009, 35, 1227–1237.

Chase M a, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K. Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol*, 2007, 179, 6318–6324.

Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MKB, Sabroe I. Toll-like receptors and chronic lung disease *Clin Sci*, 2005, 109, 125–133.

Chaudhuri N, Whyte MKB, Sabroe I. Reducing the toll of inflammatory lung disease *Chest*, 2007, 131, 1550–1556.

Chen E, Xue D, Zhang W, Lin F, Pan Z. Extracellular heat shock protein 70 promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells through activation of the ERK signaling pathway *FEBS Lett*, 2015, 589, 4088–4096.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage *Nat Rev Immunol*, 2010, 10, 826–837.

Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer *Int Immunopharmacol*, 2007, 7, 1271–1285.

Chen Y, Voegeli TS, Liu PP, Noble EG, Currie RW. Heat shock paradox and a new role of

- heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007, 6, 91–100.
- Cheng SF, Ho JWY, Chan KYY, Leung TY, Lam HS, Fong ON, Li K, Ng PC. IL-15 and macrophage secretory factors facilitate immune activation of neonatal natural killer cells by lipoteichoic acid *Cytokine*, 2013, 61, 499–505.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease *Eur Respir J Suppl*, 2001, 34, 50s–59s.
- Chung S-H, Kweon M-N, Lee HK, Choi S-I, Yang J-Y, Kim EK. Toll-like receptor 4 initiates an innate immune response to lipopolysaccharide in human conjunctival epithelial cells. *Exp Eye Res*, 2009, 88, 49–56.
- Comer DM, Elborn JS, Ennis M. Cigarette Smoke, Airway Epithelial Cells and Host Defence *Inflamm Cell Signal*, 2014, 1, 10–14800/ics.203.
- Cui X, Xing J, Liu Y, Zhou Y, Luo X, Zhang Z, Han W, Wu T, Chen W. COPD and levels of Hsp70 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) in plasma and lymphocytes among coal workers: a case-control study *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20, 473–481.
- Culpitt S V, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167, 24–31.
- De Jong PR, Schadenberg AWL, Jansen NJG, Prakken BJ. Hsp70 and cardiac surgery: Molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14, 117–131.
- De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock*, 2013, 40, 239–246.
- Decramer M, Janssens W, Miravittles M. , 2012. Chronic obstructive pulmonary diseaseU: The Lancet. 2012, str. 1341–1351. . doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9.
- Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema *Respir Res*, 2006, 7, 53.



- Diaz-Guzman E, Mannino DM. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease *Clin Chest Med*, 2014, 35, 7–16.
- Dinarello CA. IL-1: Discoveries, controversies and future directions *Eur J Immunol*, 2010, 40, 599–606.
- Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases *Blood*, 2011, 117, 3720–3732.
- Dokladny K, Lobb R, Wharton W, Ma TY, Moseley PL. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: Possible role of NF- $\kappa$ B *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15, 153–163.
- Dong J, Guo L, Liao Z, Zhang M, Zhang M, Wang T, Chen L, Xu D, Feng Y, Wen F. Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease *Int Immunopharmacol*, 2013, 17, 885–893.
- Donner CF, ZuWallack R. COPD: The Glass is Half-Full *Respir Med*, 2008, 102
- Doz E, Noulin N, Boichot E, Gu  non I, Fick L, Le Bert M, Lagente V, Ryffel B, Schnyder B, Quesniaux VFJ, Couillin I. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol*, 2008, 180, 1169–1178.
- Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res*, 2005, 6, 68.
- Duprez L, Wirawan E, Berghe T Vanden, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance *Microbes Infect*, 2009, 11, 1050–1062.
- Dybdahl B, Sl  rdahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*, 2005, 91, 299–304.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35, 495–516.
- Fan XY, Chen B, Lu ZS, Jiang ZF, Zhang SQ. Poly-l-Arginine Acts Synergistically with LPS

to Promote the Release of IL-6 and IL-8 via p38/ERK Signaling Pathways in NCI-H292 Cells *Inflammation*, 2016, 39, 47–53.

Faner R, Gonzalez N, Cruz T, Kalko SG, Agustí A. Systemic inflammatory response to smoking in chronic obstructive pulmonary disease: Evidence of a gender effect *PLoS One*, 2014, 9

Faner R, Tal-Singer R, Riley JH, Celli B, Vestbo J, Macnee W, Bakke P, Calverley PM a, Coxson H, Crim C, Edwards LD, Locantore N, Lomas D a, Miller BE, Rennard SI, Wouters EFM, Yates JC, Silverman EK, Agusti A. Lessons from ECLIPSE: a review of COPD biomarkers. *Thorax*, 2013, 1–7.

Ferat-Osorio E, Sánchez-Anaya A, Gutiérrez-Mendoza M, Boscó-Gárate I, Wong-Baeza I, Pastelin-Palacios R, Pedraza-Alva G, Bonifaz LC, Cortés-Reynosa P, Pérez-Salazar E, Arriaga-Pizano L, López-Macías C, Rosenstein Y, Isibasi A. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. *J Inflamm (Lond)*, 2014, 11, 19.

Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: Oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation *Int J COPD*, 2011, 6, 413–421.

Franco L, Terrinca J, Rodríguez AB, Espino J, Pariente JA. Extracellular heat shock proteins protect U937 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptotic cell death *Mol Cell Biochem*, 2016, 412, 19–26.

Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte a, Zieglerheitbrock HWL, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*, 1996, 87, 373–377.

Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, Washko, GR, McCubbrey AL, Chensue SW, Arenberg DA, Meldrum CA, McCloskey L, Curtis JL. Lung CD8<sup>+</sup> T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs *Respir Res*, 2013, 14, 13.

Fujita M, Nakanishi Y. The pathogenesis of COPD: lessons learned from in vivo animal models *Med Sci Monit*, 2007, 13, RA19-24.

- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6, 232–241.
- Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, Kaur M, Singh D. Increased phosphorylated p38 mitogenactivated protein kinase in COPD lungs *Eur Respir J*, 2013, 42, 28–41.
- Galloway E, Shin T, Huber N, Eismann T, Kuboki S, Schuster R, Blanchard J, Wong HR, Lentsch AB. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72 *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295, C514-520.
- Garcia-Aymerich J, Gómez FP, Benet M, Farrero E, Basagaña X, Gayete A, Paré C, Freixa X, Ferrer J, Ferrer A, Roca J, Gáldiz JB, Sauleda J, Monsó E, Gea J, Barberà J a, Agustí A, Antó JM. Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subtypes. *Thorax*, 2010, 66, 430–437.
- Garcia JJ, Martin-Cordero L, Hinchado MD, Bote ME, Ortega E. Effects of habitual exercise on the eHsp72-induced release of inflammatory cytokines by macrophages from obese zucker rats *Int J Sports Med*, 2013, 34, 559–564.
- Gibson GJ, Loddenkemper R, Lundbäck B, Sibille Y. Respiratory health and disease in Europe: The new European Lung White Book *Eur Respir J*, 2013, 42, 559–563.
- Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J*, 2011, 4, 49–60.
- Glader P, Möller S, Lilja J, Wieslander E, Löfdahl CG, von Wachenfeldt K. Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells *Respir Med*, 2006, 100, 818–827.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). , 2017. GOLD 2017 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2017.
- Godtfredsen NS, Lam TH, Hansel TT, Leon ME, Gray N, Dresler C, Burns DM, Prescott E, Vestbo J. COPD-related morbidity and mortality after smoking cessation: Status of the evidence *Eur Respir J*, 2008, 32, 844–853.
- Groenke L, Disse B. Blood eosinophil counts as markers of response to inhaled

corticosteroids in COPD? *Lancet Respir Med*, 2015, 3, e26.

Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease *Respir Res*, 2004, 5, 18.

Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, Si-Tahar M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4 *J Biol Chem*, 2004, 279, 2712–2718.

Gupta A, Cooper ZA, Tulapurkar ME, Potla R, Maity T, Hasday JD, Singh IS. Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release *J Biol Chem*, 2013, 288, 2756–2766.

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreis A, Aigner C, Lichtenauer M, Mangold A, Niederpold T, Zimmermann M, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ, Hacker S, Lambers C. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 $\alpha$  in chronic obstructive pulmonary disease: Markers for immune activation and tissue destruction *Clin Lab*, 2009, 55, 31–40.

Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, MacNee W, Make BJ, Rabe KF, Rennard SI, Sciurba FC, Silverman EK, Vestbo J, Washko GR, Wouters EFM, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: The future of COPD *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182, 598–604.

Han MK, Dransfield MT, Martinez F. Chronic obstructive pulmonary disease: Definition, clinical manifestations, diagnosis, and staging *UpToDate*, 2016, 1–47.

Han MLK, Martinez CH, Au DH, Bourbeau J, Boyd CM, Branson R, Criner GJ, Kalhan R, Kallstrom TJ, King A, Krishnan JA, Lareau SC, Lee TA, Lindell K, Mannino DM, Martinez FJ, Meldrum C, Press VG, Thomashow B, Tycon L, Sullivan JL, Walsh J, Wilson KC, Wright J, Yawn B, Zueger PM, Bhatt SP, Dransfield MT. Meeting the challenge of COPD care delivery in the USA: A multiprovider perspective *Lancet Respir Med*, 2016, 4, 473–526.

Hattar K, Savai R, Subtil FSB, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, Goldmann T, Eul B, Dahlem

- G, Fink L, Schermuly RT, Banat GA, Sibelius U, Grimminger F, Vollmer E, Seeger W, Grandel U. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: Role of COX-2 and EGFR activation *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62, 309–320.
- He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, Zhao X, Wang P. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells *Int Endod J*, 2013, 46, 128–136.
- Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, De Bruin HG, Zijlstra GJ, Van Der Vaart H, Ten Hacken NHT, Van Oosterhout AJM, Nawijn MC, Van Der Toorn M. Cigarette smoke-induced damage-associated molecular pattern release from necrotic neutrophils triggers proinflammatory mediator release *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52, 554–562.
- Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily *Eur J Immunol*, 2003, 33, 2987–2997.
- Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells *Respir Res*, 2002, 3, 22.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408, 740–745.
- Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 2006, 25, 6706–6716.
- Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4, 435–459.
- Hoshino S, Yoshida M, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Mawatari H, Yamane H, Kijima T, Kumagai T, Osaki T, Tachiba I, Kawase I. Cigarette smoke extract induces endothelial cell injury via JNK pathway *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329, 58–63.
- Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. Cytotoxic effects of cigarette smoke

- extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281, L509-16.
- Hou YF, Zhou YC, Zheng XX, Wang HY, Fu YL, Fang ZM, He SH. Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in A549 and H292 cells by histamine *Mol Immunol*, 2006, 43, 1982–1992.
- Hsieh HL, Wang HH, Wu CY, Tung WH, Yang CM. Lipoteichoic acid induces matrix metalloproteinase-9 expression via transactivation of PDGF receptors and NF-kappaB activation in rat brain astrocytes. *Neurotox Res*, 2010, 17, 344–359.
- Huang M-Y, Liao M-H, Wang Y-K, Huang Y-S, Wen H-C. Effect of Lavender Essential Oil on LPS-Stimulated Inflammation *Am J Chin Med*, 2012, 40, 845–859.
- Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, Jelić D, Dojder A, Čepelak I, Rumora L. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells *Cell Stress Chaperones*, 2017
- Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JRW. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 27, 73–77.
- Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema *Eur Respir J*, 2005, 25, 250–258.
- Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T, Kuroki Y. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus* *J Biol Chem*, 2002, 277, 24315–24320.
- J.-H. H, R.-C. Y, S.-J. L, S.-F. L, Z.-K. D, J.-L. Y, J.-R. W. Exogenous heat shock cognate protein 70 pretreatment attenuates cardiac and hepatic dysfunction with associated anti-inflammatory responses in experimental septic shock *Shock*, 2014, 42, 540–547.
- J. Verspohl E, Podlogar J. LPS-Induced Proliferation and Chemokine Secretion from BEAS-2B Cells *Pharmacol & Pharm*, 2012, 3, 166–177.
- J Z, J X, Y X, Z Z, Zhang N. Expression of heat stress protein 70 mRNA in patients with

- chronic obstructive pulmonary disease and its significance *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2005, 1, 20–23.
- Jang J, Kim W, Kim K, Chung SI, Shim YJ, Kim SM, Yoon Y. Lipoteichoic acid upregulates NF- $\kappa$ B and proinflammatory cytokines by modulating  $\beta$ -catenin in bronchial epithelial cells *Mol Med Rep*, 2015, 12, 4720–4726.
- Jean-Pierre C, Perni SC, Bongiovanni AM, Kalish RB, Karasahan E, Ravich M, Ratushny V, Skupski DW, Witkin SS. , 2006. Extracellular 70-kd heat shock protein in mid-trimester amniotic fluid and its effect on cytokine production by ex vivo-cultured amniotic fluid cellsU: American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2006, str. 694–698. . doi:10.1016/j.ajog.2006.01.066.
- Jiao Z-X, Ao Q-L, Xiong M. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Sheng Li Xue Bao*, 2006, 58, 244–254.
- Jin MS, Lee JO. Structures of TLR-ligand complexes *Curr Opin Immunol*, 2008, 20, 414–419.
- Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*, 2006, 79, 425–434.
- Joly A-L, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun*, 2010, 2, 238–247.
- Jr JSG, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System *Open Inflamm Journal*, 2011, 4, (Suppl 1-M6) 49-60, 2011, 1–12.
- Juhasz K, Lipp AM, Nimmervoll B, Sonnleitner A, Hesse J, Haselgruebler T, Balogi Z. The complex function of Hsp70 in metastatic cancer *Cancers (Basel)*, 2014, 6, 42–66.
- Kang MJ, Shadel GS. A Mitochondrial Perspective of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis *Tuberc Respir Dis*, 2016, 79, 207–213.
- Kao S-J, Lei H-C, Kuo C-T, Chang M-S, Chen B-C, Chang Y-C, Chiu W-T, Lin C-H. Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7

- macrophages. *Immunology*, 2005, 115, 366–374.
- Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Voelkel NF. , 2000. Expression of 15-lipoxygenase and evidence for apoptosis in the lungs from patients with COPDU: Chest. 2000.
- Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells *Cancer Lett*, 2008, 270, 120–131.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling *Cell Death Differ*, 2006, 13, 816–825.
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways *Front Immunol*, 2014, 5
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153, 530–534.
- Kelly E, Owen C a, Pinto-Plata V, Celli BR. The role of systemic inflammatory biomarkers to predict mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med*, 2013, 7, 57–64.
- Kim H, Liu X, Kobayashi T, Conner H, Kohyama T, Wen FQ, Fang Q, Abe S, Bitterman P, Rennard SI. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31, 483–490.
- Kim H, Liu X, Kohyama T, Kobayashi T, Conner H, Abe S, Fang Q, Wen F-Q, Rennard SI. Cigarette smoke stimulates MMP-1 production by human lung fibroblasts through the ERK1/2 pathway. *COPD*, 2004, 1, 13–23.
- Kim HP, Wang X, Lee S-J, Huang M-H, Wan Y, Ryter SW, Choi AMK. Autophagic proteins regulate cigarette smoke induced apoptosis: Protective role of heme oxygenase-1 *Autophagy*, 2008, 4, 887–895.
- Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury *Anat Cell Biol*, 2013, 46, 1.
- Kim SY, Lee JH, Huh JW, Ro JY, Oh YM, Lee S Do, An S, Lee YS. Cigarette smoke induces Akt protein degradation by the ubiquitin-proteasome system *J Biol Chem*, 2011, 286,



31932–31943.

- Koch L, Frommhold D, Buschmann K, Kuss N, Poeschl J, Ruef P. LPS- and LTA-induced expression of IL-6 and TNF- in neonatal and adult blood: Role of MAPKs and NF- B *Mediators Inflamm*, 2014, 2014
- Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang S-R, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294, L478-88.
- Kode A, Yang S-R, Rahman I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells *Respir Res*, 2006, 7, 132.
- Koff JL, Shao MXG, Kim S, Ueki IF, Nadel J a. Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol*, 2006, 177, 8693–8700.
- Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agustí A, Sonia Buist A, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: An analysis of the Framingham Offspring Cohort *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180, 3–10.
- Krause M, Heck TG, Bittencourt A, Scomazzon SP, Newsholme P, Curi R, Homem De Bittencourt PI. The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management *Mediators Inflamm*, 2015, 2015
- Kulikowska-Karpinska E, Czerw K. [Estimation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentration in the urine of cigarette smokers]. *Wiad Lek*, 2015, 68, 32–38.
- Lafferty EI, Qureshi ST, Schnare M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. *J Inflamm (Lond)*, 2010, 7, 57.
- Lan M-Y, Ho C, Lee T-C, Yang A-H. Cigarette smoke extract induces cytotoxicity on human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol*, 2007, 21, 218–223.
- Land WG. The role of damage-associated molecular patterns in human diseases: Part I -

- Promoting inflammation and immunity *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2015a, 15, 9–21.
- Land WG. The role of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in human diseases part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2015b, 15, e157–e170.
- Landis SH, Muellerova H, Mannino DM, Menezes AM, Han MLK, van der Molen T, Masakazu I, Aisanov Z, Oh YM, Davis KJ. Continuing to confront COPD international patient survey: Methods, COPD prevalence, and disease burden in 2012-2013 *Int J COPD*, 2014, 9, 597–607.
- Lee K-JJ, Kim YM, Kim DYJ, Jeoung D, Han KH, Lee S-TT, Lee Y-SS, Park KH, Park JH, Hahn J-HH. Release of heat shock protein 70 (Hsp70) and the effects of extracellular Hsp70 on matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytic U937 cells. *Exp Mol Med*, 2006, 38, 364–374.
- Lewis MI. Apoptosis as a potential mechanism of muscle cachexia in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166, 434–436.
- Li C-J, Ning W, Matthay M a, Feghali-Bostwick C a, Choi AMK. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292, L1297-303.
- Li H, Li Y, Liu D, Sun H, Su D, Yang F, Liu J. Extracellular HSP70/HSP70-PCs promote epithelial-mesenchymal transition of hepatocarcinoma cells *PLoS One*, 2013, 8
- Li W, Xu YJ, Shen HH. Effect of cigarette smoke extract on lipopolysaccharide-activated mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured cells *Chin Med J*, 2007, 120, 1075–1081.
- Li X, Peng B, Nie C, Shang P, Liu H. Evaluation of the cytotoxicity of cigarette smoke total particulate matter using three in vitro assays and two types of cells *Toxicol Mech Methods*, 2013, 23, 240–246.
- Liu F-L, Chuang C-Y, Tai Y-T, Tang H-L, Chen T-G, Chen T-L, Chen R-M. Lipoteichoic acid induces surfactant protein-A biosynthesis in human alveolar type II epithelial cells through activating the MEK1/2-ERK1/2-NF- $\kappa$ B pathway. *Respir Res*, 2012, 13, 88.

- Liu X, Togo S, Al-Mugotir M, Kim H, Fang Q, Kobayashi T, Wang X, Mao L, Bitterman P, Rennard S. NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract *Respir Res*, 2008, 9, 66.
- Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clin Exp Med*, 2010, 10, 159–167.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology *Cell*, 2001, 104, 487–501.
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway *Cytokine*, 2008, 42, 145–151.
- Lu Z, Xi S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis *Life*, 2006, 621–631.
- Luo X, Tao L, Lin P, Mo X, Chen H. Extracellular heat shock protein 72 protects schwann cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis *J Neurosci Res*, 2012, 90, 1261–1269.
- Luo X, Zuo X, Zhou Y, Zhang B, Shi Y, Liu M, Wang K, McMillian DR, Xiao X. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$  induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes *Arthritis Res Ther*, 2008, 10, R41.
- Luppi F, Aarbiou J, van Wetering S, Rahman I, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione *Respir Res*, 2005, 6, 140.
- Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, Uspenska K, Komisarenko S, Soreq H, Skok M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain *Front Mol Neurosci*, 2016, 9
- MacNee W. Oxidants and COPD *Curr Drug Target -Inflamm Allergy*, 2005, 4, 627–641.
- MacNee W. Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Biochem Soc Trans*, 2009, 37, 819–823.
- MacNee W, Calverley PM. Chronic obstructive pulmonary disease . 7: Management of COPD

*Thorax*, 2003, 58, 261–265.

MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, McElvaney NG, O'Neill SJ. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke *Respir Res*, 2007, 8, 84.

Maestrelli P, Páska C, Sietta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients *Eur Respir J*, 2003, 21, 971–976.

Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends *Lancet*, 2007, 370, 765–773.

Mannino DM, Kiriz VA. Changing the burden of COPD mortality. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2006, 1, 219–233.

Manzel LJ, Shi L, O'Shaughnessy PT, Thorne PS, Look DC. Inhibition by cigarette smoke of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent response to bacteria in the airway *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44, 155–165.

Mathur S, Walley KR, Wang Y, Indrambarya T, Boyd JH. Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circ J*, 2011, 75, 2445–2452.

Matsumoto M, Dimayuga PC, Wang C, Kirzner J, Cercek M, Yano J, Chyu K-Y, Shah PK, Cercek B. Exogenous heat shock protein-70 inhibits cigarette smoke-induced intimal thickening. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295, R1320-7.

Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C) *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60, 805–812.

McConnell JR, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets *Bioorganic Med Chem Lett*, 2013, 23, 1923–1928.

Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med*, 1997, 185, 1661–1670.

- Metcalf HJ, Lea S, Hughes D, Khalaf R, Abbott-Banner K, Singh D. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages *Clin Exp Immunol*, 2014, 176, 461–472.
- Midwood KS, Piccinini AM. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling *Mediators Inflamm*, 2010, 2010
- Milevoj Kopčinović L, Domijan A-M, Posavac K, Čepelak I, Žanić Grubišić T, Rumora L. Systemic redox imbalance in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*, 2016, 1–7.
- Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155, 1770–1776.
- Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease *J Endocrinol*, 2007, 193, 323–330.
- Mitchell S, Cosio M, Newkirk M. The link between rheumatoid arthritis and cigarette smoke *J Rheumatol*, 2010, 37, 1338–1339.
- Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: Unique roles for MD-2 *Int Immunopharmacol*, 2003, 3, 119–128.
- Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross J V, Hejal R, Templeton D, Rich EA, Toossi Z. Differential activation of MAP kinase signaling pathways and nuclear factor-kappaB in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers *Mol Med*, 2001, 7, 177–185.
- Molfino NA. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease *Curr Opin Pulm Med*, 2007, 13, 107–113.
- Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 2006, 26, 430–437.
- Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2009, 4, 19–31.

- Mortaz E, Henricks PAJ, Kraneveld AD, Givi ME, Garssen J, Folkerts G. Cigarette smoke induces the release of CXCL-8 from human bronchial epithelial cells via TLRs and induction of the inflammasome *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 2011, 1812, 1104–1110.
- Mortaz E, Lazar Z, Koenderman L, Kraneveld AD, Nijkamp FP, Folkerts G. Cigarette smoke attenuates the production of cytokines by human plasmacytoid dendritic cells and enhances the release of IL-8 in response to TLR-9 stimulation *Respir Res*, 2009, 10, 47.
- Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: Revisiting old friends from the NF- $\kappa$ B pathway *Trends Immunol*, 2005, 26, 469–476.
- Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*, 2005, 118, 4589–4592.
- Müllerova H, Agusti A, Erqou S, Mapel DW. Cardiovascular comorbidity in COPD: Systematic literature review *Chest*, 2013, 144, 1163–1178.
- Munshi N, Fernandis AZ, Cherla RP, Park I-W, Ganju RK. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor. *J Immunol*, 2002, 168, 5860–5866.
- Murshid A, Theriault J, Gong J, Calderwood SK. Investigating receptors for extracellular heat shock proteins *Methods Mol Biol*, 2011, 787, 289–302.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells *J Immunol*, 2000, 164, 5998–6004.
- Nadigel J, Audusseau S, Baglole CJ, Eidelman DH, Hamid Q. IL-8 production in response to cigarette smoke is decreased in epithelial cells from COPD patients *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26, 596–602.
- Nadigel J, Préfontaine D, Baglole CJ, Maltais F, Bourbeau J, Eidelman DH, Hamid Q. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8<sup>+</sup> T cells in chronic obstructive pulmonary disease *Respir Res*, 2011, 12, 149.
- Newkirk MM, Mitchell S, Procino M, Li Z, Cosio M, Mazur W, Kinnula VL, Hudson M,

- Baron M, Fritzler MJ, El-Gabalawy HS. Chronic smoke exposure induces rheumatoid factor and anti-heat shock protein 70 autoantibodies in susceptible mice and humans with lung disease *Eur J Immunol*, 2012, 42, 1051–1061.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 1, 3.
- Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 2000, 407, 810–816.
- Nussbaumer-Ochsner Y, Rabe KF. Systemic manifestations of COPD *Chest*, 2011, 139, 165–173.
- O'Donnell AE. Bronchiectasis in patients with COPD: A distinct COPD phenotype? *Chest*, 2011, 140, 1107–1108.
- O'Reilly P, Jackson PL, Noerager B, Parker S, Dransfield M, Gaggar A, Blalock JE. N- $\alpha$ -PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD *Respir Res*, 2009, 10, 38.
- Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14, 727–736.
- Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Orii KE, Li A, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 10260–10265.
- Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2 *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109, 7421–7426.
- Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*, 2012, 3, 79.
- Opitz B, Van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181, 1294–1309.
- Osei ET, Noordhoek JA, Hackett TL, Spanjer AIR, Postma DS, Timens W, Brandsma CA,

- Heijink IH. Interleukin-1 $\alpha$  drives the dysfunctional cross-talk of the airway epithelium and lung fibroblasts in COPD *Eur Respir J*, 2016, 48, 359–369.
- Oudijk E-JD, Nijhuis EHJ, Zwank MD, van de Graaf E a, Mager HJ, Coffey PJ, Lammers J-WJ, Koenderman L. Systemic inflammation in COPD visualised by gene profiling in peripheral blood neutrophils. *Thorax*, 2005, 60, 538–544.
- Overbeek SA, Braber S, Koelink PJ, Henricks PAJ, Mortaz E, LoTam Loi AT, Jackson PL, Garssen J, Wagenaar GTM, Timens W, Koenderman L, Blalock JE, Kraneveld AD, Folkerts G. Cigarette Smoke-Induced Collagen Destruction; Key to Chronic Neutrophilic Airway Inflammation? *PLoS One*, 2013, 8
- Pace E, Ferraro M, Di Vincenzo S, Gerbino S, Bruno A, Lanata L, Gjomarkaj M. Oxidative stress and innate immunity responses in cigarette smoke stimulated nasal epithelial cells *Toxicol Vitro*, 2014, 28, 292–299.
- Pace E, Ferraro M, Siena L, Melis M, Montalbano AM, Johnson M, Bonsignore MR, Bonsignore G, Gjomarkaj M. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells *Immunology*, 2008, 124, 401–411.
- Park J-W, Yoon JY, Kim YJ, Kyung SY, Lee SP, Jeong SH, Moon C. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition attenuates cigarette smoke extract (CSE) induced-death inducing signaling complex (DISC) formation in human lung fibroblasts (MRC-5) cells. *J Toxicol Sci*, 2010, 35, 33–39.
- Pauwels NS, Bracke KR, Dupont LL, Van Pottelberge GR, Provoost S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Lambrecht BN, Joos GF, Brusselle GG. Role of IL-1 and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD *Eur Respir J*, 2011, 38, 1019–1028.
- Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response *Lancet*, 2003, 362, 469–476.
- Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins *Trends Biochem Sci*, 2008, 33, 71–79.



- Pons AR, Noguera A, Blanquer D, Sauleda J, Pons J, Agustí AGN. Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD *Eur Respir J*, 2005, 25, 647–652.
- Pons J, Sauleda J, Regueiro V, Santos C, Lopez M, Ferrer J, Agusti AG, Bengoechea JA. Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease *Respir Res*, 2006, 7, 64.
- Postma DS, Rabe KF. The Asthma–COPD Overlap Syndrome *N Engl J Med*, 2015, 373, 1241–1249.
- Pouwels SD, Heijink IH, ten Hacken NHT, Vandenabeele P, Krysko D V, Nawijn MC, van Oosterhout a JM. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol*, 2014, 7, 215–226.
- Quintana FJ, Cohen IR. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol*, 2005, 175, 2777–2782.
- Rahman I. Oxidative stress in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseaseU: Cigarette Smoke and Oxidative Stress. 2006, str. 165–197.
- Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD *Eur Respir J*, 2006, 28, 219–242.
- Ramage L, Jones A, Whelan C. Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells in vitro *J Inflamm*, 2006, 3, 3.
- Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato G, Papi A, Maestrelli P, Maselli R, Vatrella A, Fabbri LM, Zuin R, Marsico SA, Sietta M. Increased activation of p38 MAPK in COPD *Eur Respir J*, 2008, 31, 62–69.
- Rensing SA, Maier UG. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family *J Mol Evol*, 1994, 39, 80–86.
- Rockel C, Hartung T. Systematic review of membrane components of Gram-positive bacteria responsible as pyrogens for inducing human monocyte/macrophage cytokine release *Front Pharmacol*, 2012, 3 APR

- Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages *Crit Rev Immunol*, 2011, 31, 379–446.
- Roth M. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12, 375–380.
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68, 320–344.
- Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: Where do we stand? *Mediators Inflamm*, 2013, 2013
- Rozhkova EA, Zatsepina OG, Yurinskaya MM, Vinokurov MG, Evgeniev MB. Effect of extracellular recombinant human heat shock protein 70 (HSP70) on protein pattern observed after endotoxin-induced macrophage activation *Mol Biol*, 2011, 45, 347–351.
- Rozhkova E, Yurinskaya M, Zatsepina O, Garbuz D, Karpov V, Surkov S, Murashev A, Ostrov V, Margulis B, Evgen'ev M, Vinokurov M. , 2010. Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levelsU: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010, str. 94–107. . doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05375.x.
- Rufino R, Lapa J, Silva E. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease *J Bras Pneumol*, 2006, 3, 241–248.
- Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ. Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7, 677–683.
- Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Čepelak I, Grubišić TŽ. Levels changes of blood leukocytes and intracellular signalling pathways in COPD patients with respect to smoking attitude *Clin Biochem*, 2008, 41, 387–394.
- Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Grubišić TŽ, Čepelak I. Reduction in peripheral blood leukocyte heat shock proteins 27 and 70 expression in chronic obstructive pulmonary disease *Croat Chem Acta*, 2008, 81
- Rumora L, Žanić Grubišić T. kinase signalling cascades in cell proliferation and apoptosisU:

- Biochemistry and immunology intersections. Markotić A, urednik, Trivandrum, Research Signpost, 2008, str. 151–171.
- Ryter SW, Lee S-J, Choi AM. Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med*, 2010, 4, 573–584.
- Saba JA, McComb ME, Potts DL, Costello CE, Amar S. Proteomic mapping of stimulus-specific signaling pathways involved in THP-1 cells exposed to *Porphyromonas gingivalis* or its purified components *J Proteome Res*, 2007, 6, 2211–2221.
- Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MKB. The role of TLR activation in inflammation *J Pathol*, 2008, 214, 126–135.
- Sabroe I, Read RC, Whyte MKB, Dockrell DH, Vogel SN, Dower SK. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. *J Immunol*, 2003, 171, 1630–1635.
- Saetta M. , 1997. Mechanisms of damage in COPDU: Monaldi Archives for Chest Disease. 1997, str. 586–588. .
- Saetta M. Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160, S17–S20.
- Sam L, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Fan Chung K. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: Regulation by interleukin-10 *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162, 1355–1360.
- Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, Stockley RA. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD *J Clin Immunol*, 2009, 29, 508–516.
- Sarir H, Henricks PAJ, van Houwelingen AH, Nijkamp FP, Folkerts G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD *Eur J Pharmacol*, 2008, 585, 346–353.
- Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, Nijkamp FP, Folkerts G. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages *J Inflamm (Lond)*, 2009, 6, 12.

- Schneider D, Ganesan S, Comstock AT, Meldrum CA, Mahidhara R, Goldsmith AM, Curtis JL, Martinez FJ, Hershenon MB, Sajjan U. Increased cytokine response of rhinovirus-infected airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182, 332–340.
- Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN $\gamma$  and TLR signalling pathways in macrophages *Immunobiology*, 2006, 211, 511–524.
- Seehase S, Baron-Luehr B, Kugler C, Vollmer E, Goldmann T. , 2014. Alveolar epithelial cells type II show a high sensitivity to cigarette smoke extractU: *Pneumologie* 2014. 2014, str. 68-A11. .
- Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD *Chest*, 2000, 117, 684–694.
- Sethi S. Coinfection in exacerbations of COPD: A new frontier *Chest*, 2006, 129, 223–224.
- Sethi S, Mahler DA, Marcus P, Owen CA, Yawn B, Rennard S. Inflammation in COPD: Implications for management *Am J Med*, 2012, 125, 1162–1170.
- Shackelford D a, Yeh RY. Differential effects of ischemia and reperfusion on c-Jun N-terminal kinase isoform protein and activity. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 94, 178–192.
- Shackelford DA, Yeh RY. Modulation of ERK and JNK activity by transient forebrain ischemia in rats *J Neurosci Res*, 2006, 83, 476–488.
- Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases *Neuron*, 2001, 29, 15–32.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4 *J Exp Med*, 1999, 189, 1777–1782.
- Slebos DJ, Ryter SW, Van Der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AMK. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death *Am*

*J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36, 409–417.

Somens N, Brum PO, de Miranda Ramos V, Gasparotto J, Zanotto-Filho A, Rostirolla DC, da Silva Morrone M, Moreira JCF, Pens Gelain D. Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF- $\kappa$ B and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells *Cell Physiol Biochem*, 2017, 2507–2522.

Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, Palma J, Brody JS. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, 10143–10148.

Srivastava P. New jobs for ancient chaperones *Sci Am*, 2008, 1, 50–55.

Sutherland ER, Martin RJ. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112, 819–827.

Suwara MI, Green NJ, Borthwick LA, Mann J, Mayer-Barber KD, Barron L, Corris PA, Farrow SN, Wynn TA, Fisher AJ, Mann DA. IL-1 $\alpha$  released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts *Mucosal Immunol*, 2014, 7, 684–693.

Šegvić Klarić M, Medić N, Hulina A, Žanić Grubišić T, Rumora L. Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments *Food Chem Toxicol*, 2014, 71, 97–105.

Takeda K. TLR signaling pathways *Semin Immunol*, 2004, 16, 3–9.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways *Semin Immunol*, 2004, 16, 3–9.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity *Int Immunol*, 2005, 17, 1–14.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21, 335–376.

Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation *Cell*, 2010, 140, 805–820.

Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity *Immunol Rev*, 2012, 249, 158–175.

- Teramoto S, Ishii T, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Ouchi Y. Apoptosis of circulating neutrophils and alveolar macrophages in COPD [7] *Chest*, 2005, 127, 1079–1080.
- Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells *FEBS Lett*, 2005, 579, 1951–1960.
- Tissi res A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs *J Mol Biol*, 1974, 84
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori M-A, Werts C, Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition *EMBO Rep*, 2004, 5, 1000–1006.
- Tsan M-F, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2004, 76, 514–519.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 1980, 26, 171–176.
- Tulapurkar ME, Ramarathnam A, Hasday JD, Singh IS. Bacterial Lipopolysaccharide augments febrile-range hyperthermia-induced heat shock protein 70 expression and extracellular release in human THP1 cells *PLoS One*, 2015, 10
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway *J Biol Chem*, 2002, 277, 15107–15112.
- van der Toorn M, Frentzel S, Goedertier D, Peitsch M, Hoeng J, De Leon H. A prototypic modified risk tobacco product exhibits reduced effects on chemotaxis and transendothelial migration of monocytes compared with a reference cigarette *Food Chem Toxicol*, 2015, 80, 277–286.
- van der Toorn M, Slebos D-J, de Bruin HG, Leuvenink HG, Bakker SJL, Gans ROB, Ko ter GH, van Oosterhout AJM, Kauffman HF. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am*

- J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292, L1211-8.
- van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 2004, 59, 713–721.
- Van Eden W, Bonorino C, Van Der Zee R. The immunology of cellular stress proteins *Front Immunol*, 2013, 4
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P, Berghe T Vanden, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15, 135–147.
- Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeffner-Cavaillon N, Goldman M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol*, 1997, 158, 2919–2925.
- Vestbo J. COPD: Definition and phenotypes *Clin Chest Med*, 2014, 35, 1–6.
- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary (updated 2014) *Glob Initiat Chronic Obstr Lung Dis*, 2014, 21–26.
- Vestbo J, Lange P. Natural history of COPD: Focusing on change in FEV1 *Respirology*, 2016, 21, 34–43.
- Villena J, Aso H, Kitazawa H. Regulation of Toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: Role of signalling pathways and negative regulators *Front Immunol*, 2014, 5
- Vinokurov M, Ostrov V, Yurinskaya M, Garbuz D, Murashev A, Antonova O, Evgen'Ev M. Recombinant human Hsp70 protects against lipoteichoic acid-induced inflammation manifestations at the cellular and organismal levels *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17, 89–101.

- Walters MJ, Paul-Clark MJ, McMaster SK, Ito K, Adcock IM, Mitchell J a. Cigarette smoke activates human monocytes by an oxidant-AP-1 signaling pathway: implications for steroid resistance. *Mol Pharmacol*, 2005, 68, 1343–1353.
- Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation *Front Immunol*, 2014, 5
- Weber F, Freudinger R, Schwerdt G, Gekle M. A rapid screening method to test apoptotic synergisms of ochratoxin A with other nephrotoxic substances *Toxicol Vitro*, 2005, 19, 135–143.
- Wellnitz O, Arnold ET, Bruckmaier RM. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells *J Dairy Sci*, 2011, 94, 5405–5412.
- Wheeler DS, Chase M a, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res*, 2009, 10, 31.
- White P. COPD: Challenges and opportunities for primary care *Respir Med COPD Updat*, 2005, 1, 43–52.
- Wickenden JA, Clarke MCH, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W. Cigarette Smoke Prevents Apoptosis through Inhibition of Caspase Activation and Induces Necrosis *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29, 562–570.
- Wijayanti N, Huber S, Samoylenko A, Kietzmann T, Immenschuh S. Role of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways in the lipopolysaccharide-dependent activation of heme oxygenase-1 gene expression *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6, 802–810.
- Wood A, Stockley R. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2006, 7, 130.
- Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley R a. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax*, 2002, 57, 709–714.
- Wouters EFM, Celis MPM, Breyer MK, Rutten EPA, Graat-Verboom L, Spruit MA. Co-



- morbid manifestations in COPD *Respir Med COPD Updat*, 2007, 3, 135–151.
- Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RFM, Pockley AG. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease *Heart Vessels*, 2000, 15, 18–22.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes *Clin Chim Acta*, 2004, 339, 1–9.
- Wu T -y., Juan Y -t., Hsu Y -h., Wu S -h., Liao H -t., Fung RWM, Charng Y -y. Interplay between Heat Shock Proteins HSP101 and HSA32 Prolongs Heat Acclimation Memory Posttranscriptionally in Arabidopsis *PLANT Physiol*, 2013, 161, 2075–2084.
- Wu W, Patel KB, Booth JL, Zhang W, Metcalf JP. Cigarette smoke extract suppresses the RIG-I-initiated innate immune response to influenza virus in the human lung *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300, L821–30.
- Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- $\alpha$ . *Blood*, 2000, 95, 3823–3831.
- Xing B, Bachstetter AD, Van Eldik LJ. Microglial p38 $\alpha$  MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration, through a mechanism involving TNF $\alpha$  *Mol Neurodegener*, 2011, 6, 84.
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling *Mol Immunol*, 2004, 40, 861–868.
- Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EFM. Systemic effects of smoking *Chest*, 2007, 131, 1557–1566.
- Yarovinsky F. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection *Nat Rev Immunol*, 2014, 14, 109–121.
- Yin P, Jiang C, Cheng K, Lam T, Lam K, Miller M, Zhang W, Thomas G, Adab P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study *Lancet*, 2007, 370, 751–757.

- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Kuriyama T. Increased Levels of Cell Death and Proliferation in Alveolar Wall Cells in Patients with Pulmonary Emphysema *Chest*, 2004, 125, 626–632.
- Yurinskaya M, Evgen'ev M, Antonova O, Vinokurov M. Exogenous heat shock protein HSP70 suppresses bacterial pathogen-induced activation of human neutrophils *Dokl Biochem Biophys*, 2010, 316–319.
- Yurinskaya M, Zatsepina OG, Vinokurov MG, Bobkova N V, Garbuz DG, Morozov A V, Kulikova DA, Mitkevich VA, Makarov AA, Funikov SY, Evgen 'ev MB. The Fate of Exogenous Human HSP70 Introduced into Animal Cells by Different Means *Cur Drug Deliv*, 2015, 12, 524–532.
- Yurinskaya MM, Funikov SY, Evgen'ev MB, Vinokurov MG. Exogenous heat shock protein HSP70 reduces response of human neuroblastoma cells to lipopolysaccharide *Dokl Biochem Biophys*, 2016, 469, 239–243.
- Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family *Cell Mol Immunol*, 2010, 7, 243–249.
- Zhang Y, Zhang X, Shan P, Hunt CR, Pandita TK, Lee PJ. A Protective Hsp70-TLR4 Pathway in Lethal Oxidant Lung Injury *J Immunol*, 2013, 191, 1393–1403.
- Zhe Y, Li Y, Liu D, Su DM, Liu JG, Li HY. Extracellular HSP70-peptide complexes promote the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via TLR2/4/JNK1/2MAPK pathway *Tumor Biol*, 2016, 37, 13951–13959.
- Zhou J, Eksioglu EA, Fortenbery NR, Chen X, Wang H, Epling-Burnette PK, Djeu JY, Wei S. Bone marrow mononuclear cells Up-Regulate Toll-Like receptor expression and produce inflammatory mediators in response to cigarette smoke extract *PLoS One*, 2011, 6
- Zissel G. Regulation of cytokine release by alveolar macrophages treated with interleukin-4, interleukin-10, or transforming growth factor ?? *Eur Cytokine Netw*, 1996, 7, 59–66.
- Zuo L, Lucas K, Fortuna CA, Chuang C-C, Best TM. Molecular Regulation of Toll-like Receptors in Asthma and COPD *Front Physiol*, 2015, 6

## **8. PRILOZI**

## PRILOG A: Popis kratika

ACD	aktinomicin D
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance ( <i>engl.</i> One Way Analysis of Variance)
AP-1	aktivacijski protein 1 ( <i>engl.</i> activator protein 1)
Apaf-1	čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze ( <i>engl.</i> apoptotic protease activating factor-1)
ATP	adenozin-trifosfat
B2M	$\beta$ 2-mikroglobulin
BCA	bicinkonična kiselina
BiP	protein koji veže imunoglobuline ( <i>engl.</i> binding immunoglobulin protein)
BSA	goveđi serumski albumin ( <i>engl.</i> bovine serum albumin)
CAD	DNaza aktivirana kaspazama ( <i>engl.</i> caspase-activated DNase)
CAT	test za procjenu KOPB-a ( <i>engl.</i> COPD Assessment Test)
CD	stanični marker ( <i>engl.</i> cluster of differentiation)
CHX	cikloheksimid
CLR	lektinski receptor tipa C ( <i>engl.</i> C-type lectin receptor)
CRP	C-reaktivni protein ( <i>engl.</i> C-reactive protein)
CSE	ekstrakt dima cigareta ( <i>engl.</i> cigarette smoke extract)
Ct	ciklus umnažanja u qPCR-u u kojem je postignut prag detekcije signala
CXCR3	receptor 3 za kemokine s CXC motivom
DAMP	molekularni obrazac oštećenja ( <i>engl.</i> damage-associated molecular pattern)

DC	dendritične stanice ( <i>engl.</i> dendritic cells)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt ( <i>engl.</i> death inducing signaling complex)
DMSO	dimetil-sulfoksid
dNTP	deoksinukleozid-trifostat
ECLIPSE	longitudinalno istraživanje KOPB-a provedeno s ciljem pronalaženja novih surogatnih biomarkera ( <i>engl.</i> Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points)
EDTA	etilendiamin-tetraoctena kiselina
eHsp70	izvanstanični Hsp70
ELISA	enzimimunokemijska metoda ( <i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay)
EMSA	test promjena u elektroforetskoj pokretljivosti ( <i>engl.</i> electrophoretic mobility shift assay)
ER	endoplazmatski retikulum
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom ( <i>engl.</i> extracellular signal-regulated kinase)
FADD	protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om ( <i>engl.</i> Fas-associated death domain)
FBS	fetalni goveđi serum ( <i>engl.</i> fetal bovine serum)
FEV <sub>1</sub>	forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi ( <i>engl.</i> forced expired volume in 1 second)
FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom ( <i>engl.</i> fluorescence energy resonance transfer)
FVC	forsirani vitalni kapacitet ( <i>engl.</i> forced vital capacity)
GM-CSF	čimbenik koji stimulira rast granulocitno-makrofagnih kolonija ( <i>engl.</i> granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
GOLD	globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest ( <i>engl.</i> Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
GRP	protein reguliran glukozom ( <i>engl.</i> glucose-regulated protein)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfatna kiselina
HBSS	Hankova uravnotežena otopina soli ( <i>engl.</i> Hank's balanced salt solution)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina
HMGB1	protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 ( <i>engl.</i> high mobility group box 1 protein)
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HRP	peroksidaza iz hrena ( <i>engl.</i> horseradish peroxidase)
HSE	element toplinskog šoka ( <i>engl.</i> heat shock element)
HSF	transkripcijski faktor toplinskog šoka ( <i>engl.</i> heat shock transcription factor)
Hsp	protein toplinskog šoka ( <i>engl.</i> heat shock protein)
IgM	imunoglobulin M
ICAD	inhibitor CAD-a ( <i>engl.</i> inhibitor of CAD)
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$ ( <i>engl.</i> interferon- $\gamma$ )
IFNR1	tip 1 receptora za interferon
I $\kappa$ B	inhibicijski protein $\kappa$ B ( <i>engl.</i> $\kappa$ B inhibitor)
IKK	I $\kappa$ B kinazni kompleks
IKKi	inhibitor kinaznog kompleksa I $\kappa$ B ( <i>engl.</i> inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase)
IL	interleukin
IL-1R	receptor za IL-1 ( <i>engl.</i> interleukin-1 receptor)
iNOS	inducibilna sintaza dušikovog oksida
IP-10	protein od 10 kDa kojeg inducira interferon ( <i>engl.</i> interferon induced protein of 10 kDa)

IRAK	kinaza povezana s receptorom za IL-1 ( <i>engl.</i> IL-1R associated kinase)
IRF3	čimbenik 3 regulacije interferona ( <i>engl.</i> interferon regulatory factor 3)
IκB	inhibicijski kappa B protein ( <i>engl.</i> inhibitory kappa B)
JAK	Janus kinaza
JNK	kinaza koja fosforilira N-terminalni dio transkripcijskog faktora c-Jun-a ( <i>engl.</i> c-Jun N-terminal kinase)
KOPB	kronična opstruktivska plućna bolest
LAL	lizat limulusovih amebocita
LBP	protein koji veže LPS ( <i>engl.</i> LPS binding protein)
LDH	laktat dehidrogenaza
LPS	lipopolisaharid ( <i>engl.</i> lipopolysaccharide)
LRR	ponavljajući slijedovi bogati leucinom ( <i>engl.</i> leucine-rich repeat)
LTA	lipoteikoična kiselina ( <i>engl.</i> lipoteichoic acid)
LTB4	leukotrien B4
M-CSF	čimbenik koji stimulira rast makrofagnih kolonija ( <i>engl.</i> macrophage colony stimulating factor)
Mal	adaptacijski protein sličan MyD88 ( <i>engl.</i> MyD88 adaptor-like)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom ( <i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase)
MAPKK	kinaza MAPK ( <i>engl.</i> MAPK kinase)
MAPKKK	kinaza koja aktivira kinazu protein-kinaze aktivirane mitogenom ( <i>eng.</i> mitogen-activated protein kinase kinase)
MD-2	molekula koja veže lipopolisaharid ( <i>engl.</i> molecule that confers lipopolysaccharide)
MDA	malondialdehid

MEK	MAPK/ERK kinaza
MIP-1 $\alpha$	makrofagni upalni protein 1 $\alpha$ ( <i>engl.</i> macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ )
MKK6	kinaza 6 MAPK ( <i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase kinase 6)
MMP	metaloproteinaza matriksa ( <i>engl.</i> matrix metalloproteinase)
mMRC	modificirani upitnik Vijeća za medicinska istraživanja ( <i>engl.</i> modified Medical research council)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
MyD88	čimbenik 88 mijeloidne diferencijacije ( <i>engl.</i> myeloid differentiation factor 88)
NaCl	natrij-klorid
NADH	nikotinamidadenin-dinukleotid
NEMO	modulator NF- $\kappa$ B ( <i>engl.</i> NF- $\kappa$ B essential modulator)
NF- $\kappa$ B	jezgrin čimbenik kappa B ( <i>engl.</i> nuclear factor kappa B)
NHBE	normalne humane bronhijalne epitelne stanice
NK	stanice prirodne ubojice ( <i>engl.</i> natural killer)
NLR	receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide ( <i>engl.</i> nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor)
NO	dušikov-oksid
NT	netretirane stanice
PAMP	molekularni obrazac povezan s patogenima ( <i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern)
PBEC	primarne traheobronhijalne epitelne stanice
PBEC KOPB	primarne traheobronhijalne epitelne stanice izolirane od bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolešću
PBS	otopina soli puferirana fosfatom ( <i>engl.</i> phosphate buffer saline)



PCR	lančana reakcija polimerazom ( <i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat ( <i>engl.</i> phorbol-12-myristate-13-acetate)
PPIA	peptidil-prolil-izomeraza A
PRR	receptor za obrasce ( <i>engl.</i> pattern recognition receptor)
qPCR	kvantitativni PCR ( <i>engl.</i> quantitative PCR)
RAGE	receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije ( <i>engl.</i> receptor for advanced glycation end-products)
RHD	domena homologna Rel-u ( <i>engl.</i> Rel homology domain)
rhHsp70	rekombinantni humani Hsp70
RIG-1R	receptor sličan genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina ( <i>engl.</i> retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor)
RIP-1	protein-kinaza 1 koja je u interakciji s receptorom ( <i>engl.</i> receptor-interacting protein kinase 1)
RNA	ribonukleinska kiselina ( <i>engl.</i> ribonucleic acid)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi ( <i>engl.</i> reactive oxygen species)
RSV	respiracijski sincicijski virus ( <i>engl.</i> respiratory syncytial virus)
SARM	protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive ( <i>engl.</i> sterile-alpha and Armadillo motif containing protein)
SDS	natrij-dodecilsulfat
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima ( <i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SEM	standardna pogreška ( <i>engl.</i> standard error of mean)
STAT	prenosilac signala i aktivator transkripcije ( <i>engl.</i> signal transducer and activator of transcription)
TAB	protein koji veže TAK1 ( <i>engl.</i> TAK1-binding protein)
TAD	domena koja aktivira transkripciju ( <i>engl.</i> transcriptional activation domains)

TAK1	kinaza 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta $\beta$ ( <i>engl.</i> transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -activated kinase 1)
TANK	aktivator NF- $\kappa$ B koji je povezan s članovima porodice TRAF proteina ( <i>engl.</i> TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator)
TBK1	kinaza 1 vezana na TANK ( <i>engl.</i> TANK binding kinase 1)
TEMED	tetrametiletilen-diamin
Th	T pomagački limfociti ( <i>engl.</i> T-helper cells)
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta $\beta$ ( <i>engl.</i> transforming growth factor $\beta$ )
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaza matriksa
TIPSA	medij koji sadrži transferin, inzulin, penicilin, streptomycin i amfotericin B
TIR	domena homologna kod TLR i IL-1 receptora ( <i>engl.</i> Toll/interleukin-1 receptor homology domain)
TIRAP	adaptacijski protein s TIR domenom ( <i>engl.</i> TIR adaptor protein)
TLR	receptor sličan Tollu ( <i>engl.</i> Toll-like receptor)
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ ( <i>engl.</i> tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRAF	čimbenik povezan s receptorom za TNF ( <i>engl.</i> TNF receptor-associated factor)
TRAIL	ligand sličan TNF-u koji potiče apoptozu ( <i>engl.</i> TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TRAM	adaptacijska molekula srodna TRIF-u ( <i>engl.</i> TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon $\beta$ ( <i>engl.</i> TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta ( <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	receptor 2 za VEGF ( <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor receptor 2)

## **PRILOG B: Znanstveni radovi autorice zastupljeni u Current Contents bazi**

Ovaj prilog sadrži dva originalna znanstvena rada autorice ove doktorske disertacije objavljena u časopisima koji su zastupljeni u Current Contents bazi, jedan koji obrađuje problematiku iznesenu u ovom radu, a drugi iz šireg područja problematike obrađene u ovom radu:

1. **Hulina, Andrea**; Grdić Rajković, Marija; Jakšić Despot, Daniela; Jelić, Dubravko; Dojder, Ana; Čepelak, Ivana; Rumora, Lada. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell stress & chaperones*. Oct. 24th, (2017); doi: 10.1007/s12192-017-0847-0, *E-pub ahead of print*
2. Šegvić Klarić, Maja; Medić, Nevena; **Hulina, Andrea**; Žanić Grubišić, Tihana; Rumora, Lada. Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments. *Food and chemical toxicology*. 71 (2014); 97-105.

## **9. ŽIVOTOPIS**

Andrea Hulina rođena je 15. lipnja 1986. u Zagrebu gdje je završila V. gimnaziju. Studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2005., a diplomirala je 2010. godine. Tijekom studija primala je stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH te je dobitnica Rektorove nagrade za rad „Antifungalni učinci stereoizomera mentola *in vitro*“. Pripravnički staž je odradila u Klinici za dječje bolesti Zagreb i položila stručni ispit za magistre medicinske biokemije 2012. godine.

Zaposlena je kao asistentica na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 01. 03. 2012. Akademске godine 2012./2013. upisala je poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti. Suradnica je na istraživačkim projektima Hrvatske zaklade za znanost „Uloga stresnog proteina Hsp70 u imunosno-upalnom odgovoru kod kronične opstruktivske plućne bolesti“, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Lade Rumora, te „Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta“, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić. Bila je suradnica na jednogodišnjim potporama Sveučilišta u Zagrebu znanstvenim i umjetničkim istraživanjima: „Aktivacija TLR2 i TLR4 receptora izvanstaničnim Hsp70 proteinom“ (2014. g.), „Aktivacija NLRP3 inflammasoma i TLR receptora izvanstaničnim Hsp70 i cigaretnim dimom“ (2015. g.), „Aktivacija TLR receptora u primarnim epitelnim stanicama bronho-trahealnog sustava“ (2016. g.) te „Aktivacija nekroptosoma i inflammasoma izvanstaničnim Hsp70 i cigaretnim dimom“ (2017. g.), sve pod voditeljstvom prof. dr. sc. Lade Rumora. Autorica je 3 znanstvena rada i 8 posterskih priopćenja.

Godine 2016. provela je pet mjeseci na studijskom boravku u Experimental Pulmonology and Inflammation Research (EXPIRE) laboratoriju, University Medical Center Groningen, Groningen, Nizozemska, kao dobitnica stipendije European Respiratory Society Short-time Fellowship (STRTF 2015-9759) i Erasmus+ stručne prakse.

Članica je Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju te European Respiratory Society.

## Popis radova autorice

### Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji su zastupljeni u Current Contents bazi:

1. **Hulina, Andrea**; Grdić Rajković, Marija; Jakšić Despot, Daniela; Jelić, Dubravko; Dojder, Ana; Čepelak, Ivana; Rumora, Lada. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell stress & chaperones*. Oct. 24th (2017); doi: 10.1007/s12192-017-0847-0, *E-pub ahead of print*
2. Šegvić Klarić, Maja; Medić, Nevena; **Hulina, Andrea**; Žanić Grubišić, Tihana; Rumora, Lada. Disturbed Hsp70 and Hsp27 expression and thiol redox status in porcine kidney PK15 cells provoked by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments. *Food and chemical toxicology*. 71 (2014); 97-105.

### Znanstveni radovi u ostalim časopisima:

1. Butorac, Dražan; Čelap, Ivana; Kačkov, Sanja; Robić, Vera; Miletić, Tomislav; Flegar-Meštrić, Zlata; **Hulina, Andrea**; Kuna, Krunoslav; Žanić Grubišić, Tihana; Grdić Rajković, Marija. Paraoxonase 1 activity and phenotype distribution in premenopausal and postmenopausal women. *Biochemia medica*. 24 (2014), 2; 273-280.

### Posterska priopćenja na međunarodnim ili domaćim znanstvenim skupovima:

1. **Hulina, Andrea**; Bosnar, Martina; Grdić Rajković, Marija; Jelić, Dubravko; Belamarić, Daniela; Rumora, Lada. Activity of apoptotic and inflammatory caspases in THP-1 cells treated with extracellular Hsp70. European Respiratory Society International Congress, Milano, Italija, 2017.

2. **Hulina, Andrea**; Grdić Rajković, Marija; Sučić, Mirna; Rumora, Lada. Aktivnost apoptoznih i upalnih kaspaza u NCI-H292 stanicama tretiranim izvanstaničnim Hsp70. 6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije FARMEBS 2017, Zagreb, Hrvatska, 2017.; 59.
3. Dojder, Ana; **Hulina, Andrea**; Grdić Rajković, Marija; Sučić, Mirna; Rumora, Lada. Measurement of cytokines from THP-1 and NCI-H292 cells after treatment with extracellular Hsp70. 6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije FARMEBS 2017, Zagreb, Hrvatska, 2017.; 58.
4. **Hulina, Andrea**; Grdić Rajković, Marija; Popović-Grle, Sanja; Vukić Dugac, Andrea; Samaržija, Miroslav; Rumora, Lada. Combined effect of extracellular Hsp70 and lypopolysaccharide or lypoteichoic acid on cytokine secretion in cellular models of COPD. 7. Kongres Hrvatskog torakalnog društva TORAKS 2017, Zagreb, Hrvatska, 2017.
5. **Hulina, Andrea**; Grdić Rajković, Marija; Popović-Grle, Sanja; Vukić Dugac, Andrea; Samaržija, Miroslav; Rumora, Lada. Inflammatory effects of extracellular Hsp70 in bronchial epithelial NCI-H292 cell line. East-European Conference on Pulomonology, Pécs, Mađarska, 2017.; 37-38.
6. Stojić, Ana Marija; Grdić Rajković, Marija; Čelap, Ivana; **Hulina, Andrea**; Eljuga, Damir; Butorac, Dražan. Polimorphisms of pon1 gene in patients with premalignant lesion of the cervix. Hrvatska. Fourth Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation, Zagreb, Hrvatska, 2016.; Libri Oncologici 2016; 50.
7. **Hulina, Andrea**; Gornik, Olga; Grdić Rajković, Marija; Somborac Bačura, Anita; Jelić, Dubravko; Rumora, Lada. Inflammatory effects of TLR2/4 agonists in THP-1 monocytic cell line. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the Occasion of the 40th Anniversary HDBMB2016, Split, Hrvatska, 2016.; 81.
8. Butorac, Dražan; Grdić Rajković, Marija; Čelap, Ivana; Kačkov, Sanja; Mietić, Tomislav; **Hulina, Andrea**; Žanić Grubišić, Tihana. Arylesterase activity of paraoxonase 1 in patients with premalignant lesion of the cervix. ESGO 2014: follow up in gynaecological malignancies, Torino, Italija, 2014.; International Journal of Gynecological Cancer, 2014.; 22.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## ULOGA IZVANSTANIČNOG PROTEINA Hsp70 I NJEGOVIH RECEPTORA U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Andrea Hulina

Izvanstanični Hsp70 protein (eHsp70) pripada skupini molekularnih obrazaca oštećenja (DAMP), a može aktivirati stanice imunskog sustava vezujući se za TLR2 i TLR4 receptore te tako poticati sintezu upalnih citokina. U bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolešću (KOPB), koja je karakterizirana kroničnom upalom dišnih putova, izmjerene su povišene koncentracije eHsp70 u krvi. Glavna hipoteza ovog istraživanja je da sam eHsp70 može aktivirati imunski i upalni odgovor, ali da može i modulirati upalni odgovor izazvan patogenim bakterijama ili dimom cigareta u staničnim modelima KOPB-a (NCI-H292, NHBE, PBEC (od zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om) i THP-1 stanice te monociti).

Istražen je utjecaj rekombinantnog humanog (rh) Hsp70 kada je prisutan sam ili zajedno s bakterijskim komponentama LPS-om i LTA te ekstraktom dima cigareta (CSE) na upalni odgovor određivanjem koncentracije upalnih citokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ , kao i njihov utjecaj na vijabilnost i način umiranja stanica MTS testom, određivanjem aktivnosti LDH te aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9. Mehanizmi djelovanja ovih molekula ispitani su određivanjem aktivacije TLR2 i TLR4, MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova te korištenjem specifičnih inhibitora MAPK, NF- $\kappa$ B, Hsp70, transkripcije i translacije.

rhHsp70 značajno potiče upalni odgovor u NCI-H292, PBEC i THP-1 stanicama te monocitima (pojačano izlučivanje upalnih citokina). Može modulirati upalni odgovor na LPS, LTA i CSE tako da s LPS-om uglavnom pokazuje sinergistički, a s LTA i CSE-om antagonistički tip interakcija. Sam rhHsp70 nema citotoksično djelovanje, a uglavnom djeluje zaštitno naspram citotoksičnosti LPS-a i CSE-a. Ovisno o vrsti stanica rhHsp70 može potisnuti aktivnost izvršnih kaspaza-3/7. rhHsp70 može modulirati ekspresiju TLR2, TLR4 i unutarstaničnog Hsp70. rhHsp70 djeluje preko MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova koje aktivira ovisno o vrsti stanica, koncentraciji i vremenu tretiranja.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su upalno djelovanje rhHsp70 te pokazali da on može modulirati upalni odgovor na bakterijske komponente i CSE. Istovremena prisutnost eHsp70, LPS-a, LTA i/ili CSE može dovesti do smanjenog djelovanja ili do pojačane aktivacije TLR2 i TLR4 receptora, što dovodi do pogoršanja upale i nepovoljnih posljedica za bolesnike s KOPB-om.

**Rad sadrži:** 237 stranica, 69 slika, 4 tablice, 337 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku

**Ključne riječi:** KOPB, izvanstanični Hsp70, upala, LPS, LTA, CSE

**Mentor:** prof. dr. sc. Lada Rumora, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**Ocjenjivači:** dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, red. prof. u mir. Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
red. prof. dr. sc. Karmela Barišić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
izv. prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**Datum prihvatanja rada:** 20. prosinca 2017.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### THE ROLE OF EXTRACELLULAR PROTEIN Hsp70 AND ITS RECEPTORS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Andrea Hulina

Extracellular Hsp70 (eHsp70) can act as damage-associated molecular pattern (DAMP), activate immune cells via Toll-like receptors (TLR) 2 and 4, and induce cytokine synthesis. Elevated levels of eHsp70 have been measured in blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which is characterised by chronic airway inflammation. The main hypothesis of this research is that eHsp70 alone can cause immune and inflammatory responses, but can also modulate inflammatory responses caused by pathogens or cigarette smoke in cellular models of COPD (NCI-H292, NHBE, PBEC (isolated from healthy subjects and COPD patients) and THP-1 cells and monocytes).

We explored the effects of recombinant human (rh) Hsp70 when present alone or together with bacterial components LPS and LTA as well as cigarette smoke extract (CSE) on inflammatory response determined by the levels of secreted pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ). We also assessed cell viability and mode of cell death by MTS assay, and by measurements of LDH activity secreted in cell supernatants and cellular activities of caspases-3/7, -8 and -9. Mechanisms of action of aforementioned molecules were explored by assessing TLR2, TLR4, MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways activation, and by using specific inhibitors of MAPK, NF- $\kappa$ B, Hsp70, transcription and translation.

rhHsp70 significantly induced inflammatory responses in NCI-H292, PBEC, THP-1 cells and monocytes (increased secretion of pro-inflammatory cytokines). It can modulate inflammatory response to LPS, LTA and CSE, and has shown mainly synergistic type of interaction with LPS, and mainly antagonistic type of interaction with LTA and CSE. rhHsp70 alone is not cytotoxic and mainly has protective effects against LPS and CSE induced cytotoxicity. Depending on the cell type it can also reduce caspase-3/7 activities. rhHsp70 can modulate the expression of TLR2, TLR4 and intracellular Hsp70. It exhibits its effects via MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways, but their activation is dependent on the type of cells, concentration and time.

Our results confirmed pro-inflammatory function of eHsp70 and showed that it can modulate inflammatory response to bacterial components and CSE. Combined presence of eHsp70, LPS, LTA and/or CSE could lead to desensitization or inappropriate activation of TLR2 and TLR4 receptors, which might contribute to the aggravation of chronic inflammation and lead to worsening of COPD patients' condition.

**Thesis includes:** 237 pages, 69 figures, 4 tables, 337 references; originally written in Croatian

**Keywords:** COPD, extracellular Hsp70, inflammation, LPS, LTA, CSE

**Supervisor:** Full Professor Lada Rumora, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

**Reviewers:** Full Professor Tihana Žanić Grubišić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb  
Full Professor Karmela Barišić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb  
Associate Professor Sanja Popović-Grle, PhD, Faculty of Medicine, University of Zagreb

**Thesis accepted:** 20<sup>th</sup> December 2017

The Thesis is deposited at the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and the University Library.